

SHIRLEY RAMOS DA ROSA UTIYAMA

**VARIABILIDADE ALOTÍPICA DO FATOR B DO SISTEMA COMPLEMENTO
EM PACIENTES COM DOENÇA CELÍACA E FAMILIARES. ASSOCIAÇÃO
COM A GRAVIDADE DA DOENÇA E A PRESENÇA DE
OUTROS AUTO-ANTICORPOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências
da Saúde, Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção do título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iara Taborda de
Messias Reason

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Lorete Maria
da Silva Kotze

CURITIBA

2003

PARECER

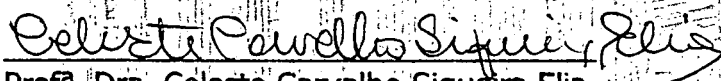
A Comissão Examinadora indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para julgar e avaliar a tese de doutorado **"Variabilidade alotípica do fator B do sistema complemento em pacientes com doença celíaca e familiares. Associação com a gravidade da doença e a presença de outros auto-anticorpos"**, de autoria da pós-graduanda SHIRLEY RAMOS DA ROSA UTIYAMA, composta pelos Professores Dra. Iara Messias-Reason (Orientadora/Presidente); Dra. Celeste Carvalho Siqueira Elia (Universidade Federal do Rio de Janeiro); Dr. João Carlos Repka (Pontifícia Universidade Católica - Paraná); Dra. Maria da Graça Bicalho e Dr. Sérgio Ioshii ambos da Universidade Federal do Paraná.

A Comissão Examinadora aprova a tese com conceito A e recomenda sua publicação após as correções sugeridas, que serão conferidas pelo orientador.

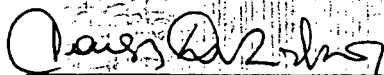
Curitiba, 28 de agosto de 2003.



Profª. Dra. Iara Messias-Reason



Profª. Dra. Celeste Carvalho Siqueira Elia



Prof. Dr. João Carlos Repka



Profª. Dra. Maria da Graça Bicalho



Prof. Dr. Sérgio Ioshii

Shirley Ramos da Rosa Utiyama

Farmacêutica Bioquímica, graduada pela Universidade Federal do Paraná, em dezembro/1977.

Mestre em Bioquímica, pelo Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, em junho/1991.

Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, desde março/2000.

Professora Adjunto do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná. Docente da Disciplina de Estágio Supervisionado de Farmacêutico Bioquímico e Disciplina de Imunologia Clínica, desde julho/1986.

Ao Edson, Larissa e Lucas, razão da minha vida
Ao meu pai, irmãos e sobrinhos, com imenso amor
À minha mãe, com amor e saudade. Imensos, eternos...

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes com doença celíaca e seus familiares, que acreditaram em nossos estudos e sem os quais este trabalho seria inviável;

À Professora Dra. Iara José Taborda de Messias Reason, pelo brilho e sabedoria na orientação e correção desta Tese e pelo material para sua realização. Agradeço ainda pela amizade de tantos anos, e certamente pelas orações. Todos tão preciosos;

À Professora Dra. Lorete Maria da Silva Kotze, pela co-orientação deste estudo, seleção e dados dos pacientes celíacos e familiares. Agradeço sua presença constante e entusiasta em nosso laboratório e a honra de fazer parte de seu grupo de pesquisa;

Ao Professor Dr. Cid Aimbiré Moraes dos Santos, que com competência, empenho e dedicação admiráveis, tem coordenado o Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

Ao Professor Dr. Obdúlio Gomes Miguel, nosso primeiro Coordenador, que acreditou que seria possível montar a Pós-Graduação do Curso de Farmácia;

Aos Professores Dr. Bonald C. de Figueiredo, Dra. Maria Suely Soares Leonart e Dr. Paulo Roberto Wunder, que constituíram a banca que analisou e aprovou a realização do Projeto de Tese;

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo empenho para conseguir e manter o reconhecimento do Curso;

Ao Professor Carlos Augusto Albini, pelo apoio e colaboração constantes no decorrer do Doutorado, e pelo carinho que tem cuidado da Disciplina de Estágio Supervisionado de Farmacêutico Bioquímico;

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, que através da co-orientadora, contribuiu na aquisição de conjugados fluorescentes e inúmeros outros reagentes;

À Professora Dra. Maria da Graça Bicalho, do Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética da UFPR, pela atenção e pelas valiosas sugestões na análise deste estudo;

Ao Professor Dr. Aguinaldo José do Nascimento e à Ângela da Matta, pelas sugestões e contribuição na análise estatística deste estudo;

Ao Professor Dr. Sérgio Ossamu Yoshii por fazer as fotografias das reações de imunofluorescência. Agradeço ainda a ele e demais patologistas que realizaram a análise das biópsias;

À Dra. Elvira M. Dói, do Setor de Sorologia do Hospital de Clínicas, pela contribuição na pesquisa dos anticorpos anti-dsDNA;

À Dra. Flávia Shibata, do Setor de Hormônios do Hospital de Clínicas, pela contribuição na pesquisa dos anticorpos anti-peroxidase;

À Professora Dra. Almeriane Welfort Santos e ao Patrick Reason, pela valiosa contribuição na revisão do *abstract*.

Ao Professor Dr. Paulo Roberto Wunder, pelo apoio constante junto à Disciplina de Imunologia Clínica;

Às alunas de Iniciação Científica, Márgara Patrícia Bini Zeni (1997/1998), Roberta Ferreira Carvalho (1999), Elisandra Grangeiro de Carvalho (2000) e Vanessa Ferreira de Camargo (2001/2002), que tanto contribuíram ao participarem em cada etapa de nossos projetos com Doença Celíaca;

Ao Farmacêutico Bioquímico Renato Mitsunori Nisihara, pelo apoio junto ao Laboratório de Imunopatologia e pelo companheirismo em todos estes anos de pesquisas.

Ao Farmacêutico Bioquímico Valmir Mocelim e aos técnicos Ivanilda Queiroz de Oliveira e Luiz Alberto Rodrigues, funcionários do Laboratório de Imunopatologia do Hospital de Clínicas, pelo apoio constante;

À Regina Montrezol, secretária do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, sempre solícita e atenciosa;

À Vilma de Oliveira Ross, da Biblioteca da Sede Botânico, pela atenção e empenho para conseguir os artigos que buscamos;

À Srta. Heliz Neves, pela eficiente contribuição com algumas figuras deste estudo;

À D^a Else de Paula Rodrigues, pela atenção e pelo cuidado constante com o Laboratório de Imunologia Clínica;

Agradeço da forma mais especial e carinhosa possível, aos dois jovens maravilhosos que são meus filhos Larissa e Lucas, pela enorme compreensão e ajuda nos mais diversos momentos e necessidades no decorrer do doutoramento;

Agradeço mais ainda ao Edson, meu marido, pelo apoio, paciência e compreensão que só alguém tão especial como ele poderia ter;

E acima de tudo, por tudo, é a Deus que mais agradeço.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	xii
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE GRÁFICOS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3 REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 O SISTEMA COMPLEMENTO.....	5
3.1.1 Ativação do Sistema Complemento.....	7
3.1.1.1 Via clássica.....	7
3.1.1.2 Via alternativa.....	10
3.1.1.3 Via das lectinas.....	12
3.1.1.4 Via final efetora.....	13
3.1.2 Controle da Ativação do Sistema Complemento.....	14
3.1.3 Conseqüências Biológicas da Ativação do Complemento.....	15
3.1.3.1 Lise de membranas celulares.....	16
3.1.3.2 Opsonização e fagocitose.....	16
3.1.3.3 Solubilização e remoção de complexos imunes.....	17
3.1.3.4 Remoção de células apoptóticas.....	18
3.1.3.5 Interface entre imunidade inata e adaptativa.....	18
3.1.3.6 Efeito pró-inflamatório.....	19
3.1.4 O Complemento na Patogenia das Doenças.....	20

3.1.5	Genética e Polimorfismo do Sistema Complemento.....	25
3.1.5.1	Polimorfismo de C3, C4 e C2 e associação com doenças.....	27
3.1.5.2	Polimorfismo de BF.....	30
3.1.5.3	Polimorfismo de BF e associação com doenças.....	32
3.2	DOENÇA CELÍACA.....	34
3.2.1	Prevalência de Doença Celíaca.....	36
3.2.2	O Glúten e a Doença Celíaca.....	37
3.2.3	Patologia da Doença Celíaca.....	39
3.2.4	Diagnóstico da Doença Celíaca.....	42
3.2.5	Terapêutica da Doença Celíaca.....	46
3.2.6	Doenças Autoimunes Associadas à DC.....	47
3.2.7	Genética da Doença Celíaca.....	49
3.2.7.1	Associação com o sistema HLA.....	50
3.2.7.2	Os genes de classe III do MHC.....	53
3.2.7.3	Associação com os genes não-HLA.....	54
3.2.8	Imunopatogenia da Doença Celíaca.....	55
3.2.9	O Sistema Complemento na Doença Celíaca.....	60
3.2.10	Polimorfismo de BF na Doença Celíaca.....	63
4	MATERIAL E MÉTODOS	64
4.1	CASUÍSTICA.....	64
4.1.1	Pacientes.....	64
4.1.2	Familiares.....	66
4.1.3	Grupo Controle.....	67
4.2	METODOLOGIA.....	67
4.2.1	Coleta de Sangue.....	67
4.2.2	Tipagem do Fator B	68
4.2.3	Pesquisa de Anticorpos Antiendomísio (EmA-IgA).....	69
4.2.3.1	Preparo do substrato.....	70

4.2.3.2	Reação de IFI para pesquisa do EmA-IgA.....	70
4.2.4	Pesquisa de Outros Auto-Anticorpos.....	71
4.2.4.1	Preparo do substrato.....	72
4.2.4.2	Reação de IFI para pesquisa de auto-anticorpos.....	73
4.2.5	Avaliação Histológica.....	73
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
5	RESULTADOS.....	76
5.1	DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALELOS DE BF EM PACIENTES CELÍACOS, FAMILIARES E CONTROLES. COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS.....	76
5.1.1	Familiares x Controles.....	79
5.1.2	Famílias Completas x Controles.....	80
5.1.3	"Familiares EmA+" x Pacientes e Controles.....	82
5.1.4	Pacientes x Familiares.....	83
5.2	DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALELOS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO EM RELAÇÃO AO SEXO.....	84
5.3	ANTICORPOS ANTIENDOMÍSIO (EmA-IgA) E FENÓTIPOS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	86
5.3.1	Positividade dos Anticorpos Antiendomísio	86
5.3.2	Títulos dos Anticorpos Antiendomísio	88
5.3.3	Análise da Distribuição dos Fenótipos e Alelos de BF nos Pacientes e Familiares de Celíaco, em Relação aos Títulos de EmA-IgA.....	90
5.4	GRAU DE LESÃO DAS BIÓPSIAS INTESTINAIS E FENÓTIPOS DE BF EM PACIENTES CELÍACOS E FAMILIARES.....	91
5.4.1	Grau de Lesão das Biópsias Intestinais.....	91
5.4.2	Distribuição dos Fenótipos e Alelos de BF nos Pacientes Celíacos e Familiares em Relação ao Grau de Lesão das Biópsias Intestinais.....	92

5.5	DEMAIS AUTO-ANTICORPOS E FENÓTIPOS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	93
5.5.1	Positividade dos Auto-Anticorpos.....	93
5.5.2	Fenótipos e Alelos de BF nos Pacientes Celíacos, em Relação à Presença de Auto-Anticorpos.....	95
5.5.3	Fenótipos e Alelos de BF nos Familiares de Celíacos, em Relação à Presença de Auto-Anticorpos.....	98
6	DISCUSSÃO.....	100
6.1	ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE BF EM PACIENTES COM DC, FAMILIARES E CONTROLES.....	101
6.2	ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE BF NOS "FAMILIARES EmA+".....	110
6.3	A PROTEÍNA BF NA PATOGENIA E SUSCEPTIBILIDADE À DC	113
6.4	ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO EM RELAÇÃO AO SEXO.....	117
6.5	POLIMORFISMO DE BF E GRAVIDADE DA DC.....	119
6.6	PRESENÇA DE AUTO-ANTICORPOS E POLIMORFISMO DE BF NA DC...	126
6.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	132
7	CONCLUSÕES.....	134
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136
	APÊNDICES.....	161
	ANEXO.....	173

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PROTEÍNAS REGULATÓRIAS SOLÚVEIS E DE MEMBRANA CELULAR.....	15
QUADRO 2 - ALELOS DE BF, C2, C3 E C4 ASSOCIADOS COM DOENÇAS.....	33
QUADRO 3 - ASSOCIAÇÕES ENTRE HLA E DC EM DIFERENTES POPULAÇÕES	51
QUADRO 4 – GRUPOS EM ESTUDO	64
QUADRO 5 - SUBSTRATO DAS REAÇÕES DE IFI PARA PESQUISA DE AUTO- ANTICORPOS.....	72
QUADRO 6 - SINOPSE DAS PRINCIPAIS ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS NO PRESENTE ESTUDO.....	99

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	9
FIGURA 2 - CROMOSSOMA 6 HUMANO.....	28
FIGURA 3 - VARIANTES POLIMÓRFICAS DE BF DETECTADAS ATRAVÉS DE ELETROFORESE DE ALTA VOLTAGEM.....	31
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MUCOSA INTESTINAL..	40
FIGURA 5 - CORTE HISTOLÓGICO DE MUCOSA DUODENAL.....	40
FIGURA 6 - RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA DC.....	58
FIGURA 7 - VARIANTES ALOTÍPICAS DE BF DETECTADAS ATRAVÉS DE ELETROFORESE DE ALTA VOLTAGEM	69
FIGURA 8 - ANTICORPO ANTIENDOMÍSIO DETECTADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES CELÍACOS, FAMILIARES E CONTROLES INCLUÍDOS NO ESTUDO.....	65
TABELA 2 - FREQUÊNCIA FENOTÍPICA DE BF EM PACIENTES CELÍACOS, FAMILIARES E CONTROLES. COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ENTRE OS GRUPOS.....	77
TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS E FREQUÊNCIAS GÊNICAS DE BF EM PACIENTES CELÍACOS E CONTROLES. COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS ENTRE OS GRUPOS.....	77
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS E FREQUÊNCIAS GÊNICAS DE BF EM FAMILIARES DE CELÍACOS E RESPECTIVOS PACIENTES....	78
TABELA 5 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS DE BF ENTRE OS FAMILIARES DE CELÍACOS, FAMÍLIAS COMPLETAS E OS CONTROLES.....	79
TABELA 6 - ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO, EM RELAÇÃO AO SEXO DOS INDIVÍDUOS	84
TABELA 7 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS DE BF ENTRE OS FAMILIARES DE CELÍACOS E OS CONTROLES, EM RELAÇÃO AO SEXO DOS INDIVÍDUOS.....	86
TABELA 8 - POSITIVIDADE DOS ANTICORPOS ANTIENDOMÍSIO (EmA-IgA) NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	87
TABELA 9 - POSITIVIDADE DE EmA-IgA EM PACIENTES COM DOENÇA CELÍACA E FAMILIARES, EM RELAÇÃO A TÍTULOS $\leq 1:5$ E $\geq 1:10$	89
TABELA 10 - FENÓTIPOS DE BF EM PACIENTES CELÍACOS E FAMILIARES EM RELAÇÃO A TÍTULOS DE EmA-IgA $\leq 1:5$ E $\geq 1:10$	91

TABELA 11 - GRAU DE LESÃO DAS BIÓPSIAS INTESTINAIS EM PACIENTES CELÍACOS E "FAMILIARES EmA+"	92
TABELA 12 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF ENTRE PACIENTES CELÍACOS COM BIÓPSIA GRAU II E GRAU III/IV.....	92
TABELA 13 - DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM FAMILIARES DE PACIENTES CELÍACOS COM BIÓPSIA GRAU II E GRAU III/IV.....	93
TABELA 14 - FREQUÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS EM PACIENTES CELÍACOS, FAMILIARES E CONTROLES.....	95
TABELA 15 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF ENTRE PACIENTES CELÍACOS COM AUTO-ANTICORPOS E SEM AUTO-ANTICORPOS.....	96
TABELA 16 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALELOS DE BF DOS PACIENTES CELÍACOS COM AUTO-ANTICORPOS E SEM AUTO-ANTICORPOS, COM OS CONTROLES.....	97
TABELA 17 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF ENTRE PACIENTES CELÍACOS ANA POSITIVOS E ANA NEGATIVOS.....	97
TABELA 18 - DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALELOS DE BF NOS PACIENTES CELÍACOS ANA POSITIVOS E ANA NEGATIVOS, EM RELAÇÃO AOS CONTROLES.....	98
TABELA 19 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF ENTRE FAMILIARES DE CELÍACOS COM AUTO-ANTICORPOS E FAMILIARES SEM AUTO-ANTICORPOS.....	99

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM DOENÇA CELÍACA E CONTROLES.....	78
GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF ENTRE FAMILIARES DE CELÍACOS E CONTROLES.....	80
GRÁFICO 3 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM FAMÍLIAS DE PACIENTES CELÍACOS E CONTROLES.....	81
GRÁFICO 4 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF ENTRE "FAMILIARES EmA+", "FAMILIARES EmA-", PACIENTES E CONTROLES.....	82
GRÁFICO 5 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF ENTRE PACIENTES CELÍACOS E FAMILIARES.....	83
GRÁFICO 6 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS BF S E BF SF ENTRE FAMILIARES DE CELÍACOS, PACIENTES E CONTROLES, EM RELAÇÃO AO SEXO DOS INDIVÍDUOS	85
GRÁFICO 7 - POSITIVIDADE DOS ANTICORPOS ANTIENDOMÍSIO NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	87
GRÁFICO 8 - TÍTULOS DE ANTICORPOS ANTIENDOMÍSIO NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	88
GRÁFICO 9 - ANTICORPOS ANTIENDOMÍSIO X BIÓPSIA INTESTINAL NA DOENÇA CELÍACA.....	89
GRÁFICO 10 - DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM PACIENTES CELÍACOS E FAMILIARES, EM RELAÇÃO AOS TÍTULOS DE ANTICORPOS ANTIENDOMÍSIO.....	90
GRÁFICO 11 - POSITIVIDADE DOS AUTO-ANTICORPOS NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAM	- Anticorpo antimicrosomal tireoideano
AGA-IgA	- Anticorpo antigliadina da classe IgA
AMA	- Anticorpo antimitocôndria
AML	- Anticorpo antimúsculo liso
ANA	- Anticorpo antinuclear
APC	- Célula apresentadora de antígeno
ARA-IgA	- Anticorpo anti-reticulina da classe IgA
BF	- Fator B
CBP	- Cirrose biliar primária
CGP	- Anticorpo anticélula gástrica parietal
CI	- Complexo imune
C1 INH	- Inibidor de C1
C1q-R	- Receptor para a molécula C1q
C3a-R	- Receptor celular do fragmento C3a
C4a-R	- Receptor celular do fragmento C4a
C5a-R	- Receptor celular do fragmento C5a
C4bp	- Proteína ligante de C4
C5b-9	- Complexo lítico de membrana de C5b à C9
CR1	- Receptor do complemento tipo 1
CR2	- Receptor do complemento tipo 2
CR3	- Receptor do complemento tipo 3
CR4	- Receptor do complemento tipo 4
CR5	- Receptor do complemento tipo 5
DAF	- Fator de decaimento da aceleração
DC	- Doença celíaca
DMID	- Diabetes mellitus insulino-dependente
ELISA	- Enzima imunoensaio
EmA-IgA	- Anticorpo antiendomísio da classe IgA
EmA-IgG	- Anticorpo antiendomísio da classe IgG
Fab	- Fragmento de ligação de antígeno da imunoglobulina
Fc	- Fragmento cristalizável da imunoglobulina
fH-R	- Receptor para o fator H
HE	- Hematoxilina eosina
HLA	- Antígeno leucocitário humano
ICA	- Anticorpo anticélulas das ilhotas
IFI	- Imunofluorescência indireta
IFN- γ	- Interferon gama
LES	- Lúpus eritematoso sistêmico
LIE	- Linfócitos intra-epiteliais
LKM	- Anticorpo antimicrosoma de fígado e rim

MAC	- Complexo de ataque à membrana
MASP-1	- Serina protease 1 associada a MBL
MASP-2	- Serina protease 2 associada a MBL
MBP	- Proteína ligante de manose
MBL	- Lectina ligante de manose
MCP	- Proteína co-fatora de membrana
MHC	- Complexo principal de histocompatibilidade
TCR	- Receptor de células T
TNF- α	- Fator de necrose tumoral α
tTG	- Transglutaminase tecidual
tTG-IgA	- Anticorpo antitransglutaminase da classe IgA

RESUMO

A via alternativa do complemento tem uma importante participação na patogênese da doença celíaca (DC) e o Fator B (BF) um papel central na ativação dessa via. A DC consiste em uma enteropatia por sensibilidade ao glúten e resulta de uma complexa interação entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais. Neste estudo avaliou-se a variabilidade alotípica de BF em pacientes com DC e familiares, visando determinar a associação com a susceptibilidade e gravidade da doença, e com a presença de auto-anticorpos. Foram estudados 76 pacientes celíacos, não relacionados (56♀, 20♂; 2-77 anos) e 150 familiares de 47 desses pacientes (87♀, 63♂; 2-75 anos). O grupo controle incluiu 97 indivíduos sadios (67♀, 30♂; 1-71 anos). Os alótipos de BF foram determinados através de eletroforese em gel de agarose, sob alta voltagem e refrigeração constante, seguida de imunofixação com anticorpo anti-BF humano. A associação com a gravidade da doença foi avaliada através dos títulos dos anticorpos antiendomísio (EmA-IgA) e das alterações histológicas da mucosa entérica. Os anticorpos EmA-IgA, anti músculo liso, mitocondrial, microssomal de fígado e rim, nuclear, célula gástrica parietal e microssomal tireoideano foram detectados por imunofluorescência indireta. Os resultados obtidos não mostraram diferença significativa na distribuição dos fenótipos e alelos de BF entre os pacientes celíacos e os controles, embora um aumento (\uparrow) significativo de BF S ($p=0,001$) e diminuição (\downarrow) de BF SF ($p=0,002$) e do alelo BF*F ($p=0,0003$) foram observados nos familiares quando comparados aos controles. Essas associações também foram observadas nas mulheres das famílias de celíacos, quando comparadas às da população normal (\uparrow BF S: $p=0,0048$; \downarrow BF SF: $p=0,0041$; \downarrow BF*F: $p=0,0022$). A comparação entre os pacientes e familiares evidenciou diminuição significativa de BF S ($p=0,026$) e tendência ao aumento de BF SF ($p=0,065$) nos pacientes. A diminuição de BF S foi significativa apenas nos pacientes do sexo feminino em relação às familiares ($p=0,023$). O EmA-IgA foi detectado em 100% dos pacientes em uso de glúten e 13,3% (20/150) dos familiares. Os títulos do EmA-IgA e o grau de lesão das biópsias, nas amostras coletadas simultaneamente, apresentaram uma alta correlação ($r=0,80388$; $p<0,00001$). A análise das variantes de BF não caracterizou associação com a gravidade da DC. Embora 18,42% dos pacientes ($p=0,012$) e 12% dos familiares ($p=0,097$) apresentassem positividade para algum dos auto-anticorpos testados, comparados com 6,18% dos controles, não ocorreu associação com as variantes de BF e a presença desses anticorpos. Uma diminuição na frequência de BF*F foi observada nos pacientes com auto-anticorpos ($p=0,044$), quando comparada à dos controles, sugerindo um papel protetor desse alelo nos pacientes quanto ao desenvolvimento de auto-anticorpos, mais especificamente os antinucleares ($p=0,047$). Concluindo, os resultados obtidos demonstram diferenças na expressão do polimorfismo de BF entre familiares de celíacos e controles. As diferenças observadas entre pacientes e familiares sugerem o alótipo BF SF como marcador de susceptibilidade e BF S como de proteção à doença em famílias de celíacos da população brasileira.

ABSTRACT

The alternative pathway of complement plays an important role in the pathogenesis of celiac disease (CD), where factor B (BF) is central to its activation. CD is a gluten-sensitive enteropathy which results from a complex interplay between genetic, immunologic and environmental factors. In this study the allotypic variability of BF has been determined in CD patients and their relatives, with the aim to evaluate its association with the susceptibility and disease severity, and with the presence of autoantibodies. Seventy-six non-related patients (56♀ and 20♂; age range 2-77 years) and 150 relatives of 47 patients (87♀ and 63♂; age range 2-75 years) were investigated. As controls, 97 healthy individuals were included (67♀ and 30♂; age range 1-71 years). The BF allotypes were determined by high-voltage agarose gel electrophoresis, followed by immunofixation with anti-human BF antibody. The association with the disease severity was evaluated by antiendomysial antibody (EmA-IgA) titers and histological findings of intestinal mucosa. The EmA-IgA, smooth muscle, mitochondrial, liver-kidney microsomal, nuclear, gastric parietal cells and thyroid microsome antibodies were tested by indirect immunofluorescence. No significative differences were observed in the distribution of BF phenotypes and alleles amongst the CD patients and the control group, although a significant increase (\uparrow) of BF S ($p=0,001$) and a decrease (\downarrow) of BF SF ($p=0,002$) and of the allele BF*F ($p=0,0003$) were observed in the relatives when compared to the controls. Corresponding associations were also observed in the females relatives, when compared to the females of the control group (\uparrow BF S: $p=0,0048$; \downarrow BF SF: $p=0,0041$; \downarrow BF*F: $p=0,0022$). A significant decrease in BF S ($p=0,026$) and an increasing tendency in BF SF variant ($p=0,065$) were observed in CD patients when compared to their relatives. The decrease of BF S was significant only in the female patients in relation to their female relatives ($p=0,023$). EmA-IgA was detected in a 100% of the celiac patients ingesting gluten, and in 13,3% (20/150) of the relatives. The EmA-IgA titers and the histological alterations showed a high correlation ($r=0,80388$; $p<0,00001$) in samples collected simultaneously. No association was found between BF variants and CD severity. Although 18,42% of patients ($p=0,012$) and 12,0% of relatives ($p=0,097$) were positive for some autoantibodies evaluated, compared with 6,18% of controls, there was no association between BF variants and these autoantibodies. A decrease in the frequency of BF*F in celiac patients with autoantibodies, when compared with controls ($p=0,044$), was observed, suggesting a protective role of this allele in the development of autoantibodies in patients, particularly antinuclear antibodies ($p=0,047$). In conclusion, differences in the expression of BF polymorphism were observed between the relatives of celiac patients and the healthy population. The differences observed between patients and their relatives suggest BF SF as a CD susceptibility marker, and BF S as a protection marker of the disease among the CD families in the Brazilian population.

1 INTRODUÇÃO

O complemento é parte integrante da resposta imunológica inata do hospedeiro e consiste em um complexo sistema de proteínas plasmáticas e associadas às membranas celulares, reconhecido como um dos principais mecanismos efetores na defesa contra infecções. Além disso, o complemento desempenha importante papel no processo inflamatório e na remoção de complexos imunes circulantes e células apoptóticas (PORCEL; VERGANI, 1993; SIM; LAICH, 2000; WALPORT, 2001a).

Nas últimas décadas, os conhecimentos adquiridos com relação à genética do complemento levaram a um melhor entendimento de várias situações clínicas graves e do papel desse na susceptibilidade às doenças. Atualmente, tem-se evidências de polimorfismo genético para a maioria das proteínas do complemento, destacando-se os componentes C2, C4 e BF, codificados por genes da região de classe III do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), no cromossoma 6 humano (BRAI; ACCARDO; BELLAVIA, 1994; CRAWFORD; ALPER, 2000). Alguns alelos desses componentes estão associados a um risco aumentado de doenças autoimunes e infecciosas, entre outras, e suportam a possibilidade de que essas variantes participariam do mecanismo etiopatogênico dessas doenças, como resultado das propriedades específicas das diferentes variantes (FIELDER et al., 1983; MESSIAS et al., 1993; WATZCO; MESSIAS, 1994).

A doença celíaca (DC) consiste em uma enteropatia por sensibilidade ao glúten, induzida pela ingestão de proteínas presentes no trigo, centeio, cevada e aveia. Atualmente, é considerada uma doença complexa ou multifatorial, resultante da interação entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais, que explicam o amplo espectro de alterações clínicas, histológicas e sorológicas observadas nos diferentes estágios de desenvolvimento da afecção (HOUSLTON; FORD, 1996; SCHUPPAN, 2000; SOLLID, 2000). De maneira geral, a DC afeta mais mulheres do que homens (ELLIOTT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998).

A DC apresenta uma forte condição hereditária, com prevalência em familiares de primeiro grau de pacientes celíacos variando na faixa de 8-18% nas diferentes populações, apresentando-se de forma monossintomática, silenciosa ou latente. A associação com outras doenças autoimunes é freqüente tanto nos pacientes como nos familiares (KING; CICLITIRA, 2000).

Segundo MOLBERG, McADAM e SOLLID (2000), a DC resulta de um efeito combinado de produtos de diferentes genes funcionantes normalmente. A existência de um espectro de estágios patológicos, portanto, está relacionada à natureza poligênica da DC. Diferentes genes de susceptibilidade contribuem, em diferentes fases, para o desenvolvimento do estágio final da doença (SOLLID, 2000).

De acordo com FERGUSON et al. (1998), o dano gerado pela ativação do complemento, através de complexos imunes, coexiste com a resposta celular em pacientes celíacos não tratados. A constatação de que frações do glúten são potentes ativadores da via alternativa do complemento reforça a sua participação no processo de lesão tecidual e é compatível com a existência de DC em pacientes com hipogamaglobulinemia (WEBSTER et al., 1981) e com as anormalidades patológicas observadas poucas horas após a reintrodução do glúten (reteste) em pacientes celíacos tratados (UNSWORTH et al., 1993).

O fator B (BF) é o componente central da via alternativa do complemento, fazendo parte da enzima C3 convertase. Sua expressão é controlada por um gene localizado na região de classe III do MHC humano. O polimorfismo de BF tornou-se um importante marcador nos estudos de associação com doenças, em especial quando tem-se caracterizada a participação da via alternativa no processo fisiopatogênico dessas, como é o caso da DC.

Embora numerosas associações entre as variantes alotípicas de BF e diferentes doenças têm sido descritas (DYER et al., 1980; ALLANNIC et al., 1985; LANCHBURY; PAL; PAPIHA, 1987; FANANAS et al., 1992), os relatos em DC são escassos, e restritos à pacientes italianos (MALAVASI et al., 1980), norte americanos (ALPER et al., 1987) e

irlandeses (MANNION et al., 19993). Especificamente na população brasileira, ainda não foi realizado nenhum estudo de associação entre a variabilidade de BF e a DC. O presente estudo visa investigar a associação entre a variabilidade de BF e o desenvolvimento e a gravidade da DC e a presença de auto-anticorpos em pacientes e familiares de celíacos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação entre a variabilidade alotípica do componente BF do complemento e a DC em pacientes e familiares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Determinar a frequência de distribuição das variantes alotípicas de BF em pacientes com DC, familiares e controles sadios com a finalidade de verificar se existe associação entre as variantes desse componente e a doença no nosso meio.

b) Estabelecer possíveis associações entre as variantes alotípicas de BF com a gravidade da DC, determinada através dos títulos de anticorpos antiendomísio e alterações histológicas da mucosa entérica.

c) Avaliar a existência de associação entre as diferentes variantes alotípicas deste componente com o sexo dos pacientes e familiares.

d) Avaliar a presença de outros auto-anticorpos circulantes em pacientes com DC, familiares e controles, e a existência de associação entre esses e as variantes alotípicas de BF.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento é considerado uma das principais vias efetoras da resposta imune e inflamatória, sendo formado por aproximadamente 35 proteínas plasmáticas e associadas a membrana celular que, uma vez ativadas, modulam reações humorais e celulares. Os hepatócitos são a principal fonte das proteínas do complemento do sangue, enquanto macrófagos e fibroblastos são os responsáveis pela síntese local em sítios teciduais (PRODINGER et al., 1999; WALPORT, 2001a).

A ativação enzimática sequencial dos componentes do complemento gera uma cascata biológica similar aos sistemas de coagulação, da fibrinólise e das quininas, o que permite uma resposta amplificada frente aos diferentes estímulos (PORCEL; VERGANI, 1993). Essa ativação é fundamental na manutenção da homeostase do hospedeiro, contribuindo tanto no combate a microorganismos, quanto na solubilização e remoção de complexos imunes circulantes (SIM, 1992; VOLANAKIS, 1998).

Uma vez ativado, através das vias clássica, alternativa e das lectinas, o complemento pode induzir a várias atividades biológicas decorrentes da interação de seus produtos de ativação com receptores celulares específicos ou pela inserção de complexos protéicos à membrana celular. Essas atividades são de grande importância no processo inflamatório, mediando a quimiotaxia e ativação de fagócitos, com estímulo da síntese de prostaglandinas, liberação de enzimas lisossomais e radicais de oxigênio (PORCEL; VERGANI, 1993; KIRSCHFINK, 1997). O complexo de ataque a membrana, C5b-9, formado como o produto final de ativação da cascata, provoca, pela sua inserção na membrana da célula alvo, lise irreversível da mesma e em concentrações sublíticas induz a liberação de mediadores inflamatórios. Além disso, existem evidências de que os peptídeos C3a, C5a e C3d possuem atividades imunoregulatórias (PORCEL; VERGANI, 1993; VOLANAKIS, 1998).

A via clássica faz parte da resposta imune específica do hospedeiro e a sua ativação depende da produção prévia de anticorpos e da formação de complexos antígeno-anticorpo. A via alternativa e a via das lectinas participam da resposta inata, sendo que a sua ativação depende de componentes específicos presentes na superfície dos microorganismos.

Os componentes da via clássica e do complexo de ataque à membrana são numerados de C1 a C9, sendo que C1, C4, C2 e C3 são componentes da via clássica. A via alternativa compreende o fator D, o fator B (BF), o fator P (properdina) e o componente C3. As proteínas da via das lectinas são designadas pelas abreviaturas MBL (lectina ligante de manose) e MASP-1, MASP-2 (MBL-serina proteases associadas). Os componentes C5, C6, C7, C8 e C9 constituem o complexo terminal de ataque à membrana (MAC). Os fragmentos peptídicos gerados por ativação e clivagem proteolítica são designados por letras minúsculas, como por exemplo C4a e C4b, resultantes da ativação de C4. Em todos os casos, exceto para C2a e C2b, o fragmento menor tem sempre a letra "a". O fragmento maior "b" permanece ligado a um complexo necessário para o próximo passo da ativação. Componentes inativos são indicados pela letra "i". As proteínas de membrana do sistema complemento são designadas de diferentes formas: tanto pela função que exercem, como por exemplo, fator de decaimento da aceleração (DAF); ou usando sistemas de grupos de diferenciação (exemplo: CD 59); ou ainda simplesmente numerados consecutivamente, como os cinco receptores do complemento, de CR1 a CR5 (BING; ALPER, 1995; JAMES, 1997; Walport, 2001a).

Os receptores do complemento encontram-se bem caracterizados e estão divididos em diferentes categorias funcionais, de acordo com seus ligantes específicos. Destacam-se os receptores para os fragmentos de C3; os receptores para os fragmentos solúveis C3a, C4a e C5a (C3a-R, C4a-R, C5a-R); o receptor para o fator H (fH-R) e ainda os receptores para C1q (C1q-R). Os receptores mais bem estudados são para os fragmentos de C3 (C3b, iC3b, C3dg) que estão covalentemente ligados às superfícies ativadoras. Esses constituem cinco tipos diferentes de receptores, denominados de CR1 a CR5, com diferenças de

afinidade para cada ligante. A maioria desses expressa-se, com diferenças de intensidade, em monócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, enquanto outros são encontrados apenas em eritrócitos (CR1), linfócitos B (CR1, CR2), linfócitos T (CR1, CR3), células NK (CR3, CR4) e células dendríticas de linfonodos (CR2). Tais receptores estão diretamente envolvidos nos processos de opsonização e fagocitose, bem como na neutralização de vírus e na eliminação de complexos imunes circulantes (ROSS, 1992).

Um sistema com o potencial pró-inflamatório e lesivo, como o sistema complemento, requer mecanismos de controle seguros. Aproximadamente metade das proteínas desse sistema atuam no controle das etapas críticas de ativação, em especial naquelas envolvidas com a geração de C3b, visando evitar a destruição de tecidos autólogos. As proteínas regulatórias associadas às membranas expressam-se em uma grande variedade de tecidos (SIM, 1992; PRODINGER et al.; 1999).

3.1.1 Ativação do Sistema Complemento

3.1.1.1 Via clássica

A via clássica foi a primeira a ser descrita e representa um potente mecanismo efetor da imunidade humoral.

O componente C1 é fundamental na ativação da via clássica e consiste em uma proteína multimérica composta de uma molécula de C1q ligada não covalentemente a duas moléculas de C1r e duas de C1s, estabilizadas na presença de íons cálcio (ROITT, BROSTOFF, MALLE, 1996).

Fisiologicamente, a ativação da via clássica tem início com a ligação da molécula C1q a complexos imunes contendo IgG ou IgM, ou a agregados de IgG (*in vitro*). As subclasses IgG₃ e IgG₁ são ativadores mais eficientes que IgG₂ e IgG₄. Além disso, outros ativadores de C1q que independem das moléculas de imunoglobulinas têm sido descritos, os quais compreendem principalmente: lipopolissacarídeos bacterianos, algumas espécies

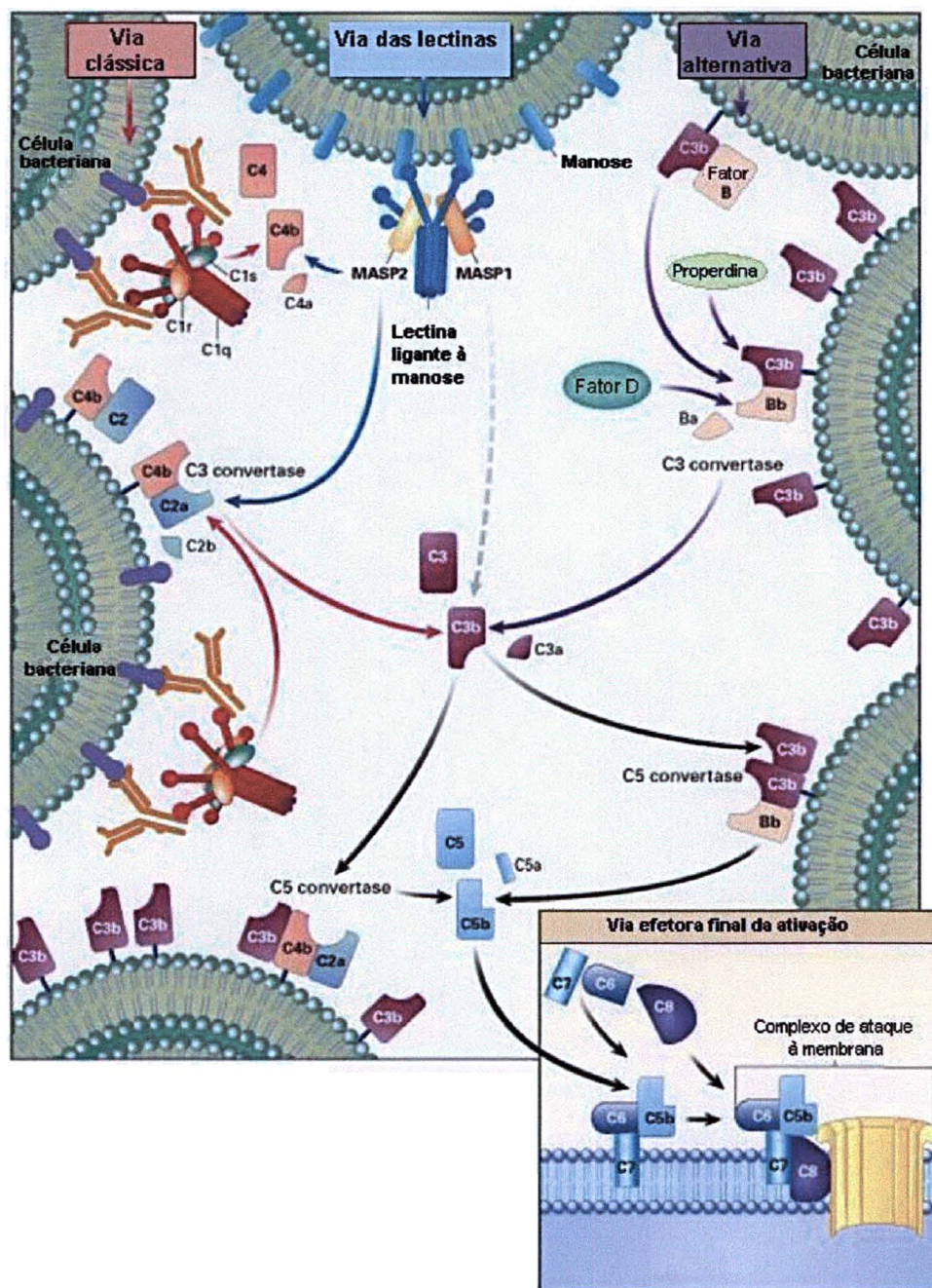
de micoplasma, vírus como EBV e HIV, parasitas como *Entamoeba*, compostos polianiónicos e proteína C reativa, entre outros (PRODINGER et al., 1999). Produtos de lesão tecidual, como membrana mitocondrial e outras membranas subcelulares, filamentos citoplásmicos, polinucleotídeos e componentes de mielina também têm demonstrado ação ativadora sobre C1 (SIM, 1992).

A interação do anticorpo específico com o antígeno induz alterações conformacionais na região Fc da molécula de imunoglobulina, que levam a sua ligação à molécula C1q. Pelo menos duas moléculas de IgG ou uma de IgM são requeridas para desencadear a ativação de C1q, através da ligação de no mínimo duas de suas extremidades globulares às moléculas de imunoglobulinas. A interação de C1q com a IgG ocorre via domínio C γ 2 e com IgM através do domínio C μ 3 da região Fc, resultando em uma alteração conformacional da molécula de C1q e ativação sequencial de C1r e C1s (JAMES, 1997; REID, 1998).

A molécula C1s, uma vez ativada, cliva e ativa tanto o componente C4, em C4a e C4b, assim como C2, em C2a e C2b, através de uma reação dependente de magnésio (figura 1). Os fragmentos C4a e C2b são subprodutos do processo de ativação. Enquanto C4a tem baixa atividade quimiotática, C2b exibe atividade de cinina. Embora grande parte das moléculas de C4b reajam com a H₂O e se percam, aproximadamente 5% dessas ligam-se, covalentemente, às superfícies ativadoras na proximidade do foco do complexo de ativação (anticorpo-C1q). Após C4b ligar-se ao alvo, tanto este pode agir como uma opsonina, como pode ocorrer sua ligação com o fragmento C2a, gerando assim a enzima C4b2a, que constitui a C3 convertase da via clássica. Essa cliva a molécula de C3, em C3a e C3b (PRODINGER et al., 1999).

Dentre as proteínas do sistema complemento, o componente C3 é o que se encontra em maior concentração no soro (1 a 1,4 mg/ml), sendo uma das proteínas mais abundantes no plasma. Sua ativação tem um papel central e comum às três vias da cascata do complemento. Embora algumas proteases, como a plasmina, ou toxinas como o

FIGURA 1 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO



FONTE: Adaptado de WALPORT (2001a)

veneno de cobra, possam atuar sobre C3, as C3 convertases da via clássica e da via alternativa são as únicas enzimas fisiologicamente relevantes na ativação de C3.

O peptídeo C3a, resultante da clivagem de C3, é uma potente anafilatoxina, que pode atuar à distância do sítio de ativação de C3. Por sua vez, a molécula C3b, através da exposição de grupamentos internos tioéster, pode formar ligação covalente com o antígeno (superfície ativadora) ou com receptores em superfícies próximas (exemplo: eritrócito), assim como com moléculas de H₂O. Aproximadamente 10% do C3b nascente liga-se ao ativador, o restante ao reagir com a H₂O, difunde-se no meio (SIM, 1992; PRODINGER et al., 1999).

Além de C3b atuar como uma forte opsonina sobre as partículas alvo, forma ainda o complexo C4b2a3b, que é a enzima C5 convertase. Essa vai atuar na última etapa de ativação da via clássica, com a clivagem de C5 em C5a e C5b. Enquanto C5a representa uma das anafilatoxinas mais potentes, a ligação de C5b a C6 dá início à via efetora final da cascata do complemento, até a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) (SIM, 1992; BING; ALPER, 1995).

3.1.1.2 Via alternativa

A via alternativa representa uma das primeiras linhas de defesa natural contra microorganismos. Uma ativação eficiente e uma amplificação instantânea dessa via depende da disponibilidade de uma superfície ativadora, tal como a parede celular bacteriana, de fungos e leveduras, lipopolissacarídeos bacterianos, toxinas, células infectadas por vírus e eritrócitos de coelho (GLOVSKY, 1994; JAMES, 1997).

O fator B (BF) tem um papel central na ativação da via alternativa. Esse consiste em uma serina protease de cadeia simples, homóloga a C2. A ligação de BF ao C3b envolve múltiplos sítios da molécula, que servem como subunidade catalítica das C3 e C5 convertases da via alternativa (VOLANAKIS, 1998).

A ativação da via alternativa tem início com a ligação covalente de C3b a uma célula alvo. O questionamento inicial era a geração do primeiro C3b, considerando ser uma via independente de anticorpo. Estudos *in vitro* mostraram que a molécula nativa de C3, na circulação, sofre hidrólise espontânea e contínua. Uma ponte de tioéster da molécula é susceptível a constante hidrólise, gerando a molécula C3i ou C3(H₂O), que tem conformação semelhante a C3b (C3b *like*) (LACHMANN, 1992).

O C3(H₂O), assim como o C3b gerado pela via clássica, pode ligar-se ao BF, em uma reação dependente de magnésio, formando os respectivos complexos C3(H₂O)B e C3bB. Esses complexos sofrem a ação do fator D, que catalisa a hidrólise da ponte peptídica arginina-lisina, clivando BF em Ba e Bb. O fragmento Ba é liberado na fase fluída, enquanto Bb, enzimaticamente ativo, liga-se a C3(H₂O) ou a C3b, formando tanto a C3 convertase da fase fluída, C3(H₂O)Bb, como a de superfície celular, C3bBb. Esses complexos podem então clivar proteínas C3 adicionais, produzindo mais C3b reativo, amplificando a reação e a geração de novos complexos de C3 convertase (C3bBb) na superfície celular. Quando C3 é convertido em C3b, as pontes tioéster da molécula tornam-se instáveis e susceptíveis a ataques nucleofílicos por elétrons de grupos -OH e -NH₂, formando rapidamente ligações covalentes com proteínas e carboidratos nas superfícies ativadoras. (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1997).

O complexo C3bBb, extremamente instável, é estabilizado pela properdina (fator P), podendo clivar novas moléculas de C3 (VOLANAKIS, 1998; PRODINGER, 1999). Se moléculas adicionais de C3b são inseridas na C3 convertase (C3bBbPC3b)_n, é gerada a C5 convertase da via alternativa, que cliva C5 em C5a e C5b, de forma semelhante à via clássica. Nessa etapa, tanto a via alternativa como a via clássica convergem para a mesma sequência terminal de eventos, levando à formação do complexo de ataque à membrana (figura 1) (JAMES, 1997).

O destino da molécula de C3b ligada a uma superfície será determinado pelo caráter ativador ou não da superfície e depende da afinidade relativa de C3 ao fator H, regulador negativo, ou ao fator B, regulador positivo da via alternativa. Nas superfícies

não ativadoras tais como as membranas das células do hospedeiro, a ligação do fator H é promovida pela sua afinidade a resíduos carregados negativamente como moléculas de ácido siálico. Sua presença na porção de carboidrato das glicoproteínas permite que C3b ligado às células do hospedeiro ligue-se rapidamente ao fator H, com subsequente clivagem pelo fator I. O fator H também dissocia o complexo C3bBb que tenha se formado nas superfícies não ativadoras ou que estão presentes na fase fluída (PRODINGER et al., 1999)

3.1.1.3 Via das lectinas

A via das lectinas foi descrita recentemente e tem como principal constituinte uma proteína plasmática ligante de manose (MBP), também conhecida como lectina ligante de manose (MBL) (IKEDA et al., 1987; TURNER, 1996). Essa pertence a família das colectinas e possui uma estrutura muito similar a da molécula de C1q, com cadeias polipeptídicas formando hélices tríplices de colágeno, reunidas em um feixe colagenoso com extremidades globulares, semelhante a um buquê de tulipas (SIM, 1992).

A concentração plasmática da MBL varia de 1µg/ml a 20µg/ml e é determinada geneticamente, elevando-se durante a fase aguda da resposta. Sabe-se, atualmente, que tanto diferenças quantitativas como qualitativas nas variantes alélicas da MBL influenciam a predisposição às infecções e outras doenças (SUPER et al., 1989).

A MBL, através da porção globular terminal de cada cadeia, reconhece, na superfície de diferentes microorganismos, resíduos específicos de carboidratos, como N-acetilglucosamina ou manose. Essa reação é dependente de cálcio (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1996; VOLANAKIS, 1998). Vários patógenos têm sido descritos como ligantes da MBL, tais como *Salmonella spp*, *Listeria sp*, *Neisseria spp*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, entre outros (PRODINGER et al., 1999).

A ligação da MBL ao alvo leva a uma alteração conformacional da mesma, que provoca a ativação de duas serina proteases, MASP-1 e MASP-2, homólogas a C1r e C1s.

A MASP-2 ao ser ativada, tal como C1s, também vai ativar C4 e C2, e levar à formação da C3 convertase da via clássica, de forma independente de anticorpo e de C1 (SIM, 1992; REID, 1998; PRODINGER et al., 1999). Por outro lado, a MASP-1 pode clivar diretamente C3 (WALPORT, 2001a).

3.1.1.4 Via final efetora

A ativação do complemento na superfície da membrana celular, independente da via inicial, leva a uma mesma via final efetora, com a formação do complexo C5b-9 ou MAC. O primeiro passo dessa via é a clivagem de C5, através das C5 convertases da via clássica e alternativa, com conseqüente formação de C5a e C5b (JAMES, 1997; PRODINGER et al., 1999).

Uma série de interações sequenciais não enzimáticas entre C5b, C6, C7, C8 e C9 resulta na formação do MAC. A molécula C5b é estabilizada ao formar um complexo hidrofílico com C6 (C5b6). A ligação de C7 a esse complexo induz a uma transição do mesmo ao estado hidrofóbico, que permite ao complexo C5b67 inserir-se, firmemente, na camada bilipídica e ligar-se à molécula de C8, que também se insere na membrana da célula alvo (figura 1) (DELVES; ROITT, 1992; VOLANAKIS, 1998).

O complexo C5b-8 tem ação lítica limitada, mas atua como agente polimerizante de C9. A ligação subsequente de até 12 ou 15 moléculas de C9, seguida da polimerização dessas, forma uma estrutura tubular não homogênea (poli-C9), inserida na superfície celular, à qual C5b-8 mantém-se ligado. O potencial lítico total do MAC depende de C9 produzir poros grandes suficiente para levar à lise da célula nucleada (ABBAS; LICHTMAN, POBER, 1997; PRODINGER et al., 1999).

Moléculas de perforina também sofrem polimerização, formando canais transmembrânicos, ao serem liberadas de grânulos citoplasmáticos de linfócitos T citotóxicos e de células *natural killer* (NK). Essas proteínas apresentam grande homologia estrutural e funcional com C9 (DELVES; ROITT, 1992).

Embora os poros produzidos por C5b-9 (MAC) permitam a passagem de íons potássio e cálcio para o interior da célula, estes são pequenos demais para permitir a saída de moléculas maiores como proteínas. Tal situação resulta no influxo de água para a célula, levando à lise osmótica ou ainda à morte celular devido a um acúmulo letal de altas concentrações de cálcio (DELVES; ROITT, 1992; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1997).

Quantidades não letais do MAC parecem estimular a produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, inclusive radicais de oxigênio, prostaglandinas, leucotrienos e interleucinas. É, portanto, possível que a resposta celular específica na ausência de lise possa ser uma importante função do MAC.

Possivelmente, o papel do MAC na defesa contra microorganismos parece ser menor do que quando atua patologicamente lesando células do hospedeiro (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1997).

3.1.2 Controle da Ativação do Sistema Complemento

Como um mecanismo potencialmente autolesivo, a ativação do complemento tem que ser evitada ou, ao menos, restringida sobre as células autólogas. Sob condições fisiológicas, a ativação descontrolada é prevenida por um vasto arsenal de proteínas regulatórias, tanto na fase fluída (plasma) como nas superfícies celulares, estando voltadas, principalmente, para os eventos centrais das três vias, que levam à ativação de C3 e à polimerização de C9 (KIRSCHFINK, 1997; PRODINGER et al., 1999). As principais proteínas e suas funções encontram-se no quadro 1.

QUADRO 1 - PROTEÍNAS REGULATÓRIAS SOLÚVEIS E DE MEMBRANA CELULAR

Proteína	Interação com	Função
Proteínas solúveis:		
Inibidor de C1 (C1 INH)	C1r, C1s	Liga-se a C1r e C1s, dissociando-os de C1q e bloqueando sua participação na via clássica
C4bp (proteína ligante de C4)	C4b	Acelera a dissociação da C3 convertase da via clássica (C4b2a) Co-fator para o fator I, mediando a clivagem de C4b
Fator H	C3b	Acelera a dissociação da C3 convertase da via alternativa (C3bBb). Co-fator para fator I, mediando a clivagem de C3b
Fator I	C4b, C3b	Compete com sítio de ligação de fator B (BF) Cliva e inativa C3b e C4b, usando o fator H, C4bp, MCP ou CR1 como co-fator
Carboxipeptidase N	C3a, C4a, C5a	Remove o resíduo arginina carboxi terminal e inativa as anafilatoxinas
Proteína S	C5b-7	Liga-se ao complexo C5b-7 e previne a inserção do MAC na membrana
SP-40,40	C5b-9	Modula a formação do MAC
Proteínas integrais de membrana:		
Proteína co-fatora de membrana (MCP, CD 46)	C3b, C4b	Co-fator para o fator I - media a clivagem de C3b e C4b
Fator de decaimento da aceleração (DAF)	C4b2b, C3bBb	Acelera a dissociação das C3 convertases da via clássica e alternativa
CD 59	C7, C8	Inibe a lise de células homólogas Bloqueia a ligação de C9 a C8, prevenindo a formação do MAC e lise

NOTA: MAC= complexo de ataque a membrana

FONTE: Adaptado de ABBAS, LICHTMAN e POBER (1997)

3.1.3 Conseqüências Biológicas da Ativação do Complemento

As atividades biológicas do complemento estão envolvidas tanto com o aspecto de lise, decorrente da inserção do complexo C5b-9 à superfície celular, como com a ligação dos produtos de ativação com receptores específicos de membrana, expressos em diferentes tipos de células.

3.1.3.1 Lise de membranas celulares

A lise de microorganismos, mediada pelo complemento, é um importante mecanismo de defesa contra certos tipos de infecções bacterianas e virais. Entretanto, muitos desses microorganismos já adquiriram formas de resistência à morte pelo complemento, como algumas bactérias gram positivas, fungos, protozoários e helmintos (BING; ALPER, 1995).

Ao contrário dos eritrócitos, muitas células, particularmente as nucleadas, são relativamente resistentes à lise pelo complemento homólogo, sendo que a ativação na sua superfície é freqüentemente sublítica. O ataque sublítico do complemento, além de proteger a célula do hospedeiro da citólise, estimula a neossíntese de proteínas, o metabolismo de ácido araquidônico e também ativa os leucócitos polimorfonucleares. Além de elevar transitoriamente o cálcio intracelular e ativar a proteína quinase C, tem o potencial de induzir atividade pró-coagulante e pró-inflamatória. Logo, a presença do MAC na superfície de células do sistema imunológico viáveis sugere um papel modulatório na fisiologia da célula à qual se ligou. É possível que a principal função biológica da cascata terminal do complemento, como um importante braço efetor da defesa humoral do hospedeiro, vá além daquela originalmente descrita (PRODINGER et al., 1999).

3.1.3.2 Opsonização e fagocitose

O favorecimento da fagocitose, através da opsonização, possivelmente, representa uma das contribuições mais importantes do complemento na defesa do hospedeiro, mediando a ligação e a ingestão de partículas estranhas, incluindo vírus, bactérias, células tumorais e complexos imunes solúveis (BING; ALPER, 1995). O componente C3 representa a fonte da principal opsonina do complemento, através das moléculas de C3b e iC3b ligadas, covalentemente, à superfície celular, mais especificamente a receptores de fagócitos como neutrófilos e monócitos/macrófagos. C3b e C4b ligam-se ao receptor CR1 e iC3b ao receptor CR3. Essas interações permitem a aderência de microorganismos aos

fagócitos do hospedeiro, levando à sua ingestão e conseqüente destruição através das enzimas lisossomais (BING; ALPER, 1995; JAMES, 1997).

As moléculas C5a e C5a *des* Arg também têm um papel crítico na fagocitose ao atraírem e ativarem fagócitos. As células fagocíticas estimuladas por C5a expressam maior quantidade de CR3 e CR4 (moléculas de adesão), que ligam os neutrófilos ao endotélio vascular, permitindo a aderência e migração desses para o sítio inflamatório (ROSS, 1992; PRODINGER et al., 1999).

O receptor para C1q (C1q-R), também conhecido como receptor de colectinas, está presente em monócitos, macrófagos, células B, granulócitos, células endoteliais, fibroblastos e plaquetas. Esse permite a interação não apenas com C1q, como com outros membros da família colectina, como a MBL. Desta forma, a presença de C1q-R em diferentes células favorece que estas realizem o englobamento de bactérias opsonizadas com MBL e de complexos imunes-C1q, regulando a fagocitose, induzindo a produção de radicais de oxigênio e favorecendo a citotoxicidade celular (ROSS, 1992; PRODINGER et al., 1999).

3.1.3.3 Solubilização e remoção de complexos imunes

Os complexos imunes (CI) são formados constantemente na circulação e a sua concentração aumenta, significativamente, diante da resposta a estímulos antigênicos intensos. A deposição desses complexos nas paredes dos vasos, com conseqüente ativação do complemento, pode levar a reações inflamatórias altamente lesivas para os tecidos próximos (ABBAS, LICHTMAN, POBER, 1997). As interações multivalentes da região Fab das imunoglobulinas com o antígeno e as interações não covalentes das regiões Fc de imunoglobulinas justapostas favorecem a formação de CI grandes e insolúveis. O complemento, através da via clássica, inibe a formação de CI grandes durante os estágios iniciais da reação antígeno-anticorpo, mantendo-os pequenos e solúveis. No entanto, quando formam-se os complexos maiores, a via alternativa, através dos componentes B, P

e C3, na presença do fator I e H, degrada-os em complexos menores e solúveis (BING; ALPER, 1995).

Os CI formados na circulação, ao ativarem o complemento, ficam opsonizados por C3b e C4b. Os eritrócitos, que possuem o receptor CR1 específico para esses fragmentos, ligam-se aos complexos (interação CR1-C3b/C4b), transportando-os até as células fagocíticas do fígado e baço, onde os mesmos são eliminados, retornando os eritrócitos à circulação (ROSS, 1992). Essa interação entre eritrócitos e CI permitiu estabelecer o papel do complemento na remoção dos CI da circulação. Enquanto os eritrócitos possuem aproximadamente 500 moléculas CR1/célula, os leucócitos têm um número superior a 50.000 CR1/célula. No entanto, mais de 85% do CR1 do sangue está nos eritrócitos, devido ao elevado número desses na circulação (PRODINGER et al., 1999).

3.1.3.4 Remoção de células apoptóticas

Outra propriedade biológica do complemento, relacionada à interação com receptores celulares, é a remoção de células apoptóticas pelos macrófagos. A ligação de C1q, proteína C reativa e IgM às células que tenham sofrido apoptose, leva à ativação do complemento na superfície das mesmas, favorecendo a interação com receptores do complemento presentes em macrófagos, com subsequente captura e destruição das células. A eliminação de células mortas contribui com a redução da exposição de auto-antígenos ao sistema imunológico (MEVORACH et al., 1998; WALPORT, 2001b).

3.1.3.5 Interface entre a imunidade inata e adaptativa

O complemento desempenha, também, um importante papel fisiológico na interação entre a imunidade inata e adaptativa. A molécula C1q, ao ligar-se às moléculas de anticorpos nos complexos imunes, ativando a via clássica, representa um dos elos dessa interação. A opsonização de microorganismos, mediada por complemento, facilita a captura e apresentação de antígenos pelas células apresentadoras, via receptor do complemento. Ainda a ativação de células B, modulada por co-receptores, especialmente

CR2, favorece a interação dessa célula com antígenos e sua subsequente ativação (PRODINGER et al., 1999; WALPORT, 2001b).

3.1.3.6 Efeito pró-inflamatório

As anafilatoxinas C3a, C4a e C5a são mediadores humorais reconhecidos principalmente por suas funções pró-inflamatórias e imunoreguladoras, que atuam, efetivamente, na defesa do hospedeiro. Embora os efeitos pró-inflamatórios das anafilatoxinas sejam benéficos no contexto das infecções ou injúrias localizadas, há um número de doenças não infecciosas e síndromes, nas quais as anafilatoxinas desempenham um papel deletério (EMBER; JAGELS; HUGLI, 1998).

Os efeitos biológicos das anafilatoxinas estão relacionados à expressão dos receptores específicos (C3a-R, C4a-R, C5a-R) em vários tipos de células, principalmente mastócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos. Ainda, a expressão de C5a-R é encontrada em basófilos, macrófagos, células endoteliais, células de músculo liso, células epiteliais e astrócitos. (ABBAS; LICHTMAN; PODER, 1997; ROSS, 1992).

As anafilatoxinas C3a, C4a e C5a são pequenos peptídeos catiônicos, de estrutura muito similar, sendo C5a a mais potente dessas, seguida de C3a e C4a (BING; ALPER, 1995).

As anafilatoxinas, principalmente C3a e C5a, ao ligarem-se aos receptores de mastócitos e basófilos, causam degranulação e liberação de mediadores vasoativos, em especial histamina e leucotrienos. Esses induzem aumento na permeabilidade vascular e contração da musculatura lisa. C5a tem ainda múltiplos efeitos, promovendo derrame vascular e exocitose, além de estimular a expressão de p-selectina nas células do endotélio vascular, favorecendo a adesão de fagócitos. C5a tem intensa atividade quimiotática sobre neutrófilos; induz maior expressão de proteínas de adesão, como CR3 e CR4, mediando o tráfico desses nos tecidos; além de estimular a produção de radicais de oxigênio e prostaglandinas. C3a tem atividade similar, porém menos intensa (ROITT; BROSTOFF; MALLE, 1996; EMBER; JAGELS; HUGLI, 1998; PRODINGER et al., 1999).

A atividade das anafilatoxinas, nestas reações, é dependente da arginina-C-terminal. A molécula C5a tem meia vida curta na circulação devido a ação da enzima plasmática carboxipeptidase-N, que cliva a arginina-C-terminal da molécula de C5a, gerando C5a *des* Arg, que é menos ativa que C5a. De forma similar, tem-se a *des* Arg de C3a e C4a, com atividade biológica totalmente reduzida (BING; ALPER, 1995). Embora C5a *des* Arg tenha afinidade de ligação reduzida, comparando-se com C5a, essa é o maior ligante de C5a-R *in vivo*, devido à sua ligação com uma proteína sérica (cochemotaxina) que favorece a interação com C5a-R (ROSS, 1992).

O fragmento C2b, liberado pela clivagem de C2, também participa do processo inflamatório. Esse interage com a plasmina e apresenta atividade similar a cinina, levando à contração da musculatura lisa, aumento da permeabilidade vascular e dor (BING; ALPER, 1995; JAMES, 1997).

Estudos experimentais mostram que os produtos de ativação de BF, os fragmentos Ba e Bb, também apresentam ação pró-inflamatória. HAMURO, HADDING e BITTER-SUERMANN (1978) demonstraram que a molécula Ba, embora não promova a contração da musculatura lisa e liberação de histamina por mastócitos, tem a propriedade de estimular a migração de polimorfonucleares de porquinhos da Índia. Por outro lado, segundo GÖTZE, BIANCO e COHN (1979), o fragmento Bb, além de fazer parte da C3 convertase da via alternativa, induz alterações na função de macrófagos, *in vitro*, aumentando o espalhamento desses. MESSIAS et al. (1985) demonstraram um aumento significativo de Ba em pacientes brasileiros com paracoccidiodomicose em atividade, ressaltando a participação dessas moléculas e da via alternativa na resposta imunológica do hospedeiro ao fungo, bem como na evolução da infecção.

3.1.4 O Complemento na Patogenia das Doenças

Deficiências hereditárias de quase todos os componentes do complemento e da maior parte das proteínas regulatórias e receptores têm sido detectadas em seres humanos.

Essas deficiências, usualmente herdadas de forma autossômica recessiva, são raras e como o complemento não é dosado rotineiramente em indivíduos saudáveis, torna-se difícil determinar a incidência das mesmas nas diferentes populações. Além disso, apesar das várias atividades biológicas do complemento, muitas vezes as deficiências dos componentes não levam a sintomas clínicos, em função da atuação conjunta das diferentes vias de ativação (ROTHER; ROTHER, 1992).

Basicamente, tem-se três associações principais entre complemento e doenças: 1) a deficiência associada à susceptibilidade a infecções; 2) as consequências de anormalidades na regulação do complemento e, 3) a deficiência associada às doenças inflamatórias (WALPORT, 2001a).

As deficiências do complemento relacionadas com o aumento de susceptibilidade a infecções envolvem diversos componentes. A deficiência de C3 compromete as atividades relacionadas com a opsonização e fagocitose, causando uma susceptibilidade maior às infecções por bactérias piogênicas, tais como *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. O mecanismo normal de defesa contra essas bactérias é a opsonização com anticorpos, seguida de ativação do complemento, fagocitose e morte celular. Os fragmentos C3b e iC3b são as principais opsoninas nesses casos (ABBAS; LICHTMAN; PODER, 1997). As deficiências dos componentes terminais do MAC vão comprometer a atividade lítica e estão relacionadas quase que exclusivamente com infecções por *Neisseria meningitidis*. Esse fato sugere que a defesa normal contra estas cepas envolve, principalmente, a função bactericida do complemento, com a formação de um canal lítico na bactéria (ROTHER; ROTHER, 1992; BING; ALPER, 1995).

A deficiência de MBL também está envolvida com maior susceptibilidade às infecções piogênicas recorrentes, por comprometimento da opsonização (SUPER et al., 1989). Em algumas situações, porém, maiores concentrações da proteína podem, também, estar relacionadas com a severidade da infecção. Pacientes da Etiópia, com hanseníase virchowiana, apresentaram maior concentração de MBL em relação aos controles saudáveis. Sugere-se que a opsonização, por MBL, de organismos intracelulares como as

micobactérias, possa favorecer a sua entrada nas células (WALPORT, 2001a). Por outro lado ainda, alguns vírus e bactérias intracelulares utilizam-se de moléculas regulatórias e receptores do complemento como um meio de entrar nas células. É o caso do vírus Epstein-Barr com o CR2 de linfócitos B; do vírus da imunodeficiência humana (HIV) com os receptores CR1, CR2 e CR3; o vírus do sarampo com a proteína regulatória MCP e alguns picornavírus com a molécula de DAF, entre outros (WALPORT, 2001a).

As deficiências do complemento, gerando anormalidades na regulação, estão envolvidas com diversas proteínas. A deficiência do inibidor de C1, transmitida de forma autossômica dominante, é uma das anormalidades mais comuns e está relacionada com o angioedema hereditário. A doença é recorrente, sendo que traumas ou infecções constituem um gatilho para a ativação do complemento. A ativação de C1 é descontrolada, com geração de C4b2a e ativação de cininas. Os fatores de vasopermeabilidade como C4a, bradicinina, histamina e C2b são os maiores envolvidos no edema e dor, com severos sintomas quando afeta a mucosa intestinal, podendo causar a morte, por sufocação, ao levar à obstrução de vias aéreas (GLOVSKY, 1994).

Deficiência do fator I e H estão associadas com anormalidade de degradar C3b, com conseqüente descontrole da clivagem de C3 pela C3 convertase da via alternativa (C3bBb). Isto induz a uma situação de deficiência secundária, por consumo, tanto de C3 como de BF, levando a infecções por bactérias piogênicas, assim como por meningococos e gonococos (ROTHER; ROTHER, 1992; GLOVSKY, 1994). A deficiência do fator H também predispõe a glomerulonefrites. Embora não se conheça exatamente o mecanismo, é possível que a ativação contínua de C3, próximo à membrana basal glomerular, leve à deposição de C3b no glomérulo e conseqüente inflamação. O fator nefrítico de C3 também tem sido associado a glomerulonefrites, principalmente em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Esse consiste em um auto-anticorpo que se liga e estabiliza a C3 convertase (C3bBb), levando a um consumo descontrolado de C3 e remoção inadequada de complexos imunes, favorecendo o processo inflamatório no glomérulo (ABBAS;

LICHTMAN; PODER, 1997). Deficiências dos fatores P e D também estão associadas com aumento da susceptibilidade a infecções (BING; ALPER, 1995).

A hemoglobinúria paroxística noturna é um exemplo de consequência na falha de regulação do MAC, por comprometimento da expressão do DAF e de CD59 na membrana celular. A causa primária da doença é um defeito genético na síntese de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que representa uma âncora para a expressão de mais de 40 proteínas de membrana. A ausência dessas duas proteínas de controle é responsável pela grande sensibilidade do eritrócito à lise pelo complemento, especialmente na condição fisiológica de baixo pH noturno (BING; ALPER, 1995; PRODINGER et al., 1999).

O complemento contribui ainda para a inflamação e dano tecidual em doenças neurodegenerativas e autoimunes, especialmente com manifestações renais e dermatológicas, assim como na injúria isquêmica e reperfusão, ou ainda em situações de choque (PRODINGER et al., 1999).

O complemento pode ser ativado nos tecidos através dos complexos imunes e de fosfolípidos e proteínas mitocondriais, expostos após isquemia tecidual e reperfusão. Esses ativam o complemento diretamente, ligando C1q ou MBL, ou indiretamente, através de anticorpos naturais ou proteína C reativa, que ativam a via clássica. O complemento que é ativado nos sítios de injúria tecidual vai causar dano através da deposição do MAC e de ligantes como C4b e C3b que ativam leucócitos com receptores do complemento. As anafilatoxinas C3a e C5a liberadas também contribuem para amplificar a injúria ao promover o influxo e ativação de células inflamatórias. Células e tecidos necróticos não expressam as moléculas regulatórias que previnem a ativação do complemento em tecidos normais (WALPORT, 2001b).

O estado de choque que pode acompanhar a bacteremia por microorganismos gram negativos é mediado, em parte, pela ativação de complemento por endotoxinas. As anafilatoxinas liberadas estimulam a agregação intravascular de neutrófilos, levando à formação de êmbolos que se depositam na microvasculatura pulmonar, podendo levar ao edema e choque (ROITT; BROSTOFF; MALLE, 1996).

Sob condições fisiológicas, o complemento contribui efetivamente na eliminação de microrganismos recobertos de anticorpos, promovendo a remoção dos CI. Entretanto, quando os CI não são eliminados, o complemento torna-se cronicamente ativado, promovendo a inflamação. Um exemplo é na resposta de anticorpos a auto-antígenos que não podem ser carreados do organismo, por estarem limitados a um determinado órgão, no qual a doença se expressa, como na síndrome de Goodpasture e na miastenia gravis. Infecções crônicas, como a hepatite C e endocardite bacteriana, também tendem a perpetuar a formação de CI, com intensa ativação e consumo de complemento (WALPORT, 2001b).

No lúpus eritematoso sistêmico (LES), a ativação de complemento, por CI que se depositam em múltiplos órgãos, está diretamente ligada à fisiopatogenia da doença. Por outro lado, a deficiência homozigótica hereditária de C1q, C1r, C1s, C4 e C2 está fortemente associada com a susceptibilidade ao LES. O comprometimento na ativação da via clássica, decorrente dessa deficiência, vai refletir, diretamente, na solubilização, bem como na remoção dos CI pelos eritrócitos. Deficiência de CR1 também compromete a remoção dos complexos, favorecendo a deposição desses em diferentes tecidos e conseqüente inflamação (GLOVSKY, 1994; ABBAS; LICHTMAN; PODER, 1997; PRODINGER, et al., 1999). Outras doenças mediadas por CI, como artrite reumatóide, glomerulonefrites e vasculites, também apresentam mecanismos semelhantes a estes envolvidos na sua patogenia. (BING; ALPER, 1995).

Por outro lado ainda, a participação do complemento na eliminação de células apoptóticas dos tecidos é fundamental na remoção de resíduos celulares, como componentes citoplasmáticos e nucleares parcialmente degradados. Se o complemento falha nesse aspecto, tal material pode acumular-se e suscitar uma resposta autoimune (WALPORT, 2001b).

Na DC, a propriedade do glúten de ativar a via alternativa (UNSWORTH et al., 1993), assim como a presença de CI ativando a via clássica (MOHAMMED et al., 1976),

estão diretamente envolvidos no processo inflamatório presente na mucosa intestinal dos pacientes. Tais aspectos serão abordados no item 3.2.9.

3.1.5 Genética e Polimorfismo do Sistema Complemento

Durante as últimas décadas, muitos conhecimentos foram adquiridos com relação a genética do complemento, o que levou a um melhor entendimento de várias situações clínicas severas (CRAWFORD; ALPER, 2000). O estudo genético das proteínas do complemento teve início com a descoberta de deficiências do complemento em animais e humanos. Em 1919, Moore descobriu uma linhagem de porquinhos da Índia com deficiência de complemento. O soro desses animais não mediava a citólise dependente de anticorpo (RITTNER, 1992).

O primeiro relato de polimorfismo do complemento foi descrito por ALPER e PROPP (1968), para terceiro componente humano (C3). Desde então, conhecimentos sobre deficiências e polimorfismo, em diferentes espécies, a nível fenotípico e genotípico têm se acumulado. Tais estudos têm permitido detectar indivíduos deficientes homozigotos e carreadores heterozigotos, em estudos em famílias, e reunir evidências para associações de certos alelos com diferentes doenças (PRODINGER et al., 1999).

Recentemente, avanços a nível molecular têm facilitado a caracterização dos alelos do complemento. Tanto a caracterização fenotípica das variantes protéicas (alotipagem) como a caracterização genômica do DNA (genotipagem) são usadas correntemente (PRODINGER et al., 1999). Os alelos compreendem as variações de um mesmo gene e diferem entre si por pequenas mudanças na sequência de seus nucleotídeos. Esses ocupam o mesmo *locus* gênico em cromossomas homólogos e são os responsáveis por uma dada característica. O fenótipo consiste no conjunto de características visíveis ou detectáveis em um indivíduo ou organismo e é determinado pelo seu genótipo e pelas condições ambientais. As diferenças fenotípicas detectadas por métodos imunológicos são denominadas de aloantígenos, enquanto as diferenças por carga e/ou peso molecular,

detectadas por métodos eletroforéticos, são denominadas variantes eletroforéticas ou alótipos.

O termo polimorfismo se refere à ocorrência simultânea de diferentes genótipos, resultantes da combinação de alelos de um mesmo *locus*, que podem ou não resultar em diferentes fenótipos. Porém, para que um *locus* gênico seja considerado polimórfico, o seu alelo mais comum não deve apresentar frequência populacional superior a 99%, de modo que o outro alelo polimorfo tenha frequência igual ou maior que 1%. Entretanto, a definição clássica preconiza que o termo se refira ao gene (ou *locus* gênico) e não a cada alelo individualmente. Os alelos de um gene polimórfico são denominados polimorfos (aqueles com frequência entre 1% e 99%) e idiomorfos (com frequência inferior a 1%).

A fenotipagem (alotipagem) dos componentes do complemento pode ser determinada por alterações no peso molecular, mobilidade eletroforética, ponto isoeletrico e atividade funcional das diferentes variantes. A metodologia mais utilizada para sua detecção é a da diferença de cargas elétricas, através de eletroforese em gel de agarose sob alta voltagem, que é o método básico para a separação das variantes. O gel específico e o sistema tampão variam para cada componente e anticorpos monoclonais permitem distinguir diferentes alótipos. (Mc LEAN; WINKELSTEIN, 1984; RITTNER; SCHNEIDER, 1988). A genotipagem é realizada por estudos do polimorfismo de fragmentos de restrição (RFPL) e por reação em cadeia da polimerase (PCR), usando *primers* específicos, seguido de digestão enzimática e sequenciamento (RITTNER, 1992; PRODINGER et al., 1999).

Atualmente, existem evidências de polimorfismo genético para a maioria dos componentes do complemento, destacando-se os componentes iniciais que fazem parte das C3 convertases (C4, C2, C3 e BF), assim como algumas proteínas regulatórias solúveis e de membrana, além dos receptores do complemento (RITTNER; SCHNEIDER, 1989; RITTNER, 1992; BRAI; ACCARDO; BELLAVIA, 1994).

O aumento significativo da frequência de determinadas variantes genéticas de C4, C2, C3 e BF em uma série de doenças como lúpus eritematoso sistêmico, hanseníase,

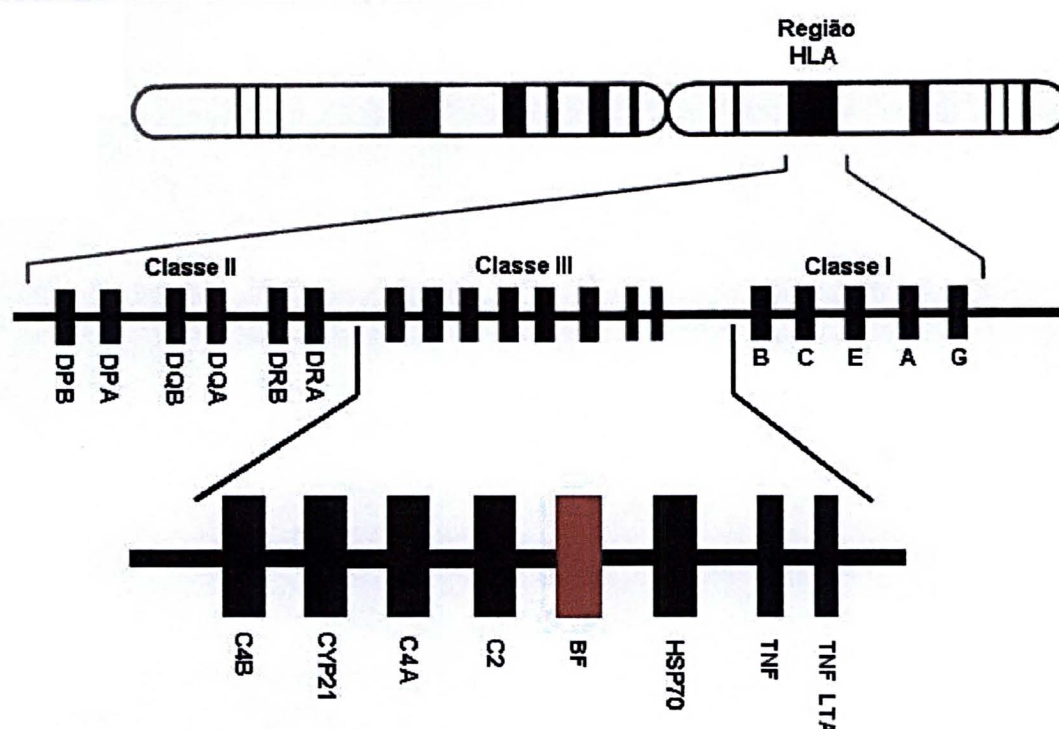
esclerose múltipla, glomerulonefrite crônica, diabetes mellitus insulino-dependente, artrite reumatóide e espondilite anquilosante, entre outras, suporta a possibilidade de que estas variantes participariam do mecanismo etiopatogênico dessas doenças, como resultado das propriedades biológicas específicas das diferentes variantes (FIELDER et al., 1983; MC LEAN; WINKELSTEIN, 1984; MESSIAS et al., 1993; BRAI; ACCARDO; BELLAVIA, 1994; WATZCO; MESSIAS, 1994).

3.1.5.1 Polimorfismo de C3, C4 e C2 e associação com doenças

A expressão de C3 é controlada por um gene localizado no cromossoma 19. Em humanos, duas variantes alélicas principais foram identificadas, baseado na mobilidade eletroforética dos alótipos. São estas: C3*S (*slow*) e C3*F (*fast*), além de mais 20 alelos raros (ALPER et al., 1973). A variante C3*S é a mais comum, com uma frequência de 0.79, 0.95, 0.97 e 0.99 em brancos, negros americanos, índios sul americanos e população asiática, respectivamente (LAMBRIS; SAHU; WETSEL, 1998). O significado biológico desse grande número de variantes ainda não está esclarecido, sendo poucos os relatos de associação do polimorfismo de C3 com doenças. Alguns estudos mostram aumento da frequência de C3*F em pacientes com artrite reumatóide, fibrose cística e em pacientes idosos com arterosclerose (RITTNER; SCHNEIDER, 1988). A diminuição dessa variante foi descrita em pacientes com esquizofrenia (FANANAS et al., 1992). A associação de C3*S com nefropatia por IgA, lipodistrofia parcial e cirrose em crianças indianas também foi observada (BRAI; ACCARDO; BELLAVIA, 1994).

Os componentes C2, C4 e BF são codificados por genes localizados na região de classe III do MHC, no braço curto do cromossoma 6, e são herdados como uma só unidade, denominada complotipo (figura 2). Dessas três proteínas, C4 é a mais polimórfica, sendo o único componente do complemento que existe como dois isótipos distintos, e cuja síntese é codificada por dois genes diferentes, C4A e C4B. Pelo menos 40 alelos para cada gene já foram relatados, incluindo os alelos nulos, C4A*Q0 e C4B*Q0,

FIGURA 2 - CROMOSSOMA 6 HUMANO



FONTE: Adaptado de SOLLID e THORSBY (1993)

responsáveis pela ausência da proteína C4A e C4B no soro (Q= quantidade zero) (LAMBRIS; SAHU; WETSEL, 1998). Apesar da maior parte dos casos de alelos nulos ser devido à deleção do gene, aproximadamente 40% deles decorre da não expressão de genes não alterados (BARBA; RITTNER; SCHNEIDER, 1993). Alelos nulos de C4A ou C4B ocorrem com uma frequência de 10 a 20% em diferentes populações (RITTNER, 1992).

Os dois isótipos de C4 (C4A e C4B) diferem apenas em quatro resíduos de amino ácidos, encontrados na cadeia alfa junto à ligação tioéster. Essa diferença confere capacidade funcional distinta aos produtos gênicos: C4A, preferencialmente, forma pontes covalentes com grupos amina, enquanto C4B liga-se, mais avidamente, a grupos hidroxila. Assim, enquanto C4B apresenta um potencial hemolítico pelo menos quatro vezes maior que C4A, esse último (C4A) tem maior capacidade de fazer ligações

covalentes com antígenos protéicos nos complexos imunes (RITTNER, 1992; BRAI; ACCARDO; BELLAVIA, 1994).

Considerando tais aspectos, aliado à importante participação dos componentes C2 e C4 na remoção de complexos imunes circulantes, é compreensível a crescente lista de associação de deficiência de C4A com doenças como lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatóide, esclerose sistêmica, cirrose biliar primária, poliartrite crônica, leishmaniose visceral, glomerulonefrite crônica, lepra, paracoccidiodomicose, diabetes mellitus insulino-dependente e doença de Chagas, entre outras (RITTNER, 1992).

Uma frequência aumentada de C4A*Q0 e C4B*Q0 foi observada em pacientes com LES e lúpus eritematoso discóide, em relação à população normal. Na esclerodermia, C4B*Q0 homozigotos ou heterozigotos foram observados com maior frequência do que nos controles normais. Associação de alelos nulos de C4 também foram descritas com herpes gestacional, doença de Takayasu e na hepatite crônica autoimune (RITTNER; SCHNEIDER, 1988).

Decorrente de um desequilíbrio de ligação com DR3, foi observado um aumento de C4A*Q0 em pacientes com DC (RITTNER et al., 1984) e com diabetes mellitus insulino-dependente (SEGURADO et al., 1991). Deficiência de C4B tem sido observada em doenças infecciosas como paracoccidiodomicose (MESSIAS et al., 1991).

O polimorfismo do componente C2 em humanos foi descrito, inicialmente, por ALPER (1976), e é caracterizado por uma variante comum (C2*C) e apenas alguns raros alótipos. A deficiência de C2 é a deficiência genética mais comum dentre as proteínas do complemento, sendo frequentemente associada com LES, em caucasóides (FRONEK, et al., 1990). Devido ao polimorfismo limitado de C2, são poucas as associações de suas variantes com doenças, podendo-se citar a associação do alelo C2*B com retinopatia proliferativa, em diabetes mellitus insulino-dependente (BERTRAMS, et al., 1980).

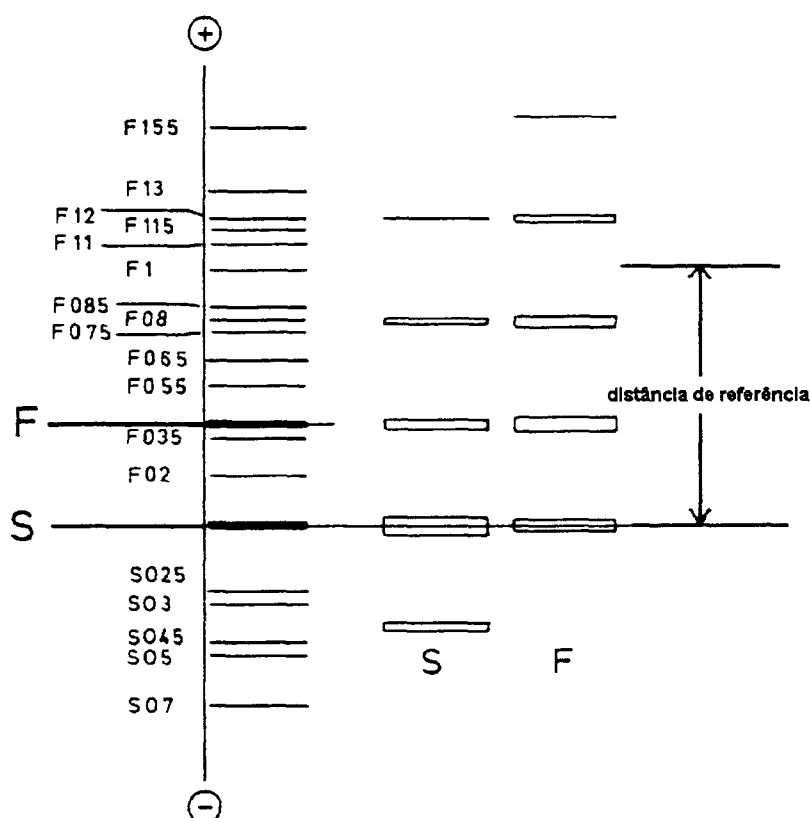
3.1.5.2 Polimorfismo de BF

O fator B (BF) foi originalmente descrito como uma glicoproteína II rica em glicina, apresentando dois fragmentos de conversão: GAG (Ba) e GGG (Bb). A molécula BF consiste em uma serina protease (93 KDa), homóloga à C2, com concentração plasmática de 200 µg/ml. O fragmento menor, Ba (30-40 KDa), constitui a região amino terminal de BF e o fragmento Bb (60-70 KDa) constitui a região carboxi-terminal da molécula (VOLANAKIS, 1998). O polimorfismo de BF foi detectado por eletroforese de alta voltagem em gel de agarose, e subsequente imunofixação com um anticorpo anti-fator B humano (ALPER; BOENICH; WATSON, 1972). Foi demonstrado, nessa descrição inicial, a existência de dois alelos comuns, BF*S e BF*F, localizados no fragmento Ba, e outros mais raros localizados no fragmento Bb.

Atualmente, o polimorfismo de BF constitui-se em duas variantes principais, F e S, e duas menos frequentes, F1 e S07, além de aproximadamente 18 variantes raras (figura 3). A distância entre o alótipo S e a variante F1 foi escolhida como distância referência (GESERICK et al., 1990). A atividade hemolítica é máxima para BF*F, seguida de BF*SF e BF*S. A ocorrência de alelos nulos de BF (BF*Q0) é extremamente rara, sugerindo que a ativação de C3 pela via alternativa seja de maior importância biológica do que pela via clássica (RITTNER, SCHNEIDER, 1988), não se tendo relatos de deficiência homozigótica do mesmo (RITTNER, 1992).

As frequências dos alelos comuns e raros de BF variam nas diferentes populações. De acordo com relatos de vários autores, para o alelo BF*S essa é próxima de 0.71 em brancos, 0.80 em orientais e de 0.28 a 0.44 em negros. Para o alelo BF*F tem-se a frequência aproximada de 0.28 em brancos, 0.19 em orientais e de 0.51 a 0.65 em negros (ALPER; BOENICH; WATSON, 1972; MAUFF; GAUCHEL; HITZEROTH, 1976; TOKUNAGA, et al., 1982). Variantes com mobilidade muito rápida ou muito lenta são raras na maioria das populações, com poucas exceções, como em populações que tenham passado por longos períodos de isolamento geográfico e étnico. Um exemplo é a

FIGURA 3 - VARIANTES POLIMÓRFICAS DE BF DETECTADAS ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE E ALTA VOLTAGEM



FONTE: Adaptado de GESERICK et al. (1990)

população basca, em que o alelo BF*F1 atinge uma frequência de 0.126 (DE MOUZON, et al., 1979). Outros estudos sobre polimorfismo de BF em populações do Japão (AMENO; NANIKAWA, 1984), Grécia (TRANTAPHYLLIDIS et al., 1989) e Eslováquia (STANEKOVA; STARSIA; NIKS, 1990) têm sido relatados, com resultados similares aos dos grupos étnicos já citados.

No Brasil, a variabilidade alotípica de C2, BF, C4A e C4B foi estudada por MESSIAS et al. (1994), em um grupo de 225 indivíduos sadios da região sul do país, incluindo caucasóides, mulatos e negros. Nos caucasóides, a frequência de distribuição dos alelos de BF foi similar aos relatos de outras populações caucasóides.

3.1.5.3 Polimorfismo de BF e associação com doenças

Embora o BF apresente um polimorfismo limitado em comparação com o observado para C4 e para os antígenos de classe I e classe II do MHC, esse representa um importante marcador nos estudos de susceptibilidade genética a doenças. Nos últimos anos, várias associações entre o polimorfismo de BF e doenças têm sido descritas (RITTNER; SCHNEIDER, 1988; BRAI; ACCARDO; BELLAVIA, 1994; CRAWFORD; ALPER, 2000).

Diversos estudos têm evidenciado um risco aumentado de desenvolver diabetes mellitus insulino-dependente em indivíduos que apresentem o alelo BF*F1, podendo representar um marcador de susceptibilidade, especialmente em pacientes pediátricos (RAUM, et al., 1979; ORREN; PRESCOTT, 1983; ALLANNIC et al., 1985; MISIANO et al., 1989). Os estudos de DE MOUZON et al. (1979), no entanto, ressaltam que o haplótipo associado à doença, HLA-B18 C2*C BF*F1 C4A*3 B*Q0, envolvendo um alelo nulo no *locus* C4B, não permite afirmar se BF*F1 representa uma associação primária ou secundária com a doença, embora o desequilíbrio de ligação entre HLA-B18 e BF*F1 seja mais forte nos pacientes do que nos controles. O alelo BF*F1 pode, também, estar envolvido na patogênese da nefropatia membranosa idiopática (DYER et al., 1980).

A associação dos alelos BF*F1 e BF*S07 com hanseníase virchowiana, em negros, foi observada por MAUFF; HITZEROTH e KLEEGERG (1983). MESSIAS et al. (1993), embora tenham detectado associação da deficiência de C4B com a presença de eritema nodoso hansênico, não caracterizaram participação dos alelos de BF como fator de risco no desenvolvimento da hanseníase em pacientes brasileiros.

Os estudos de associação do polimorfismo de BF em pacientes com esclerose múltipla, de diferentes regiões, mostraram diferentes resultados, possivelmente associados às diferenças de distribuição de frequência de BF entre as próprias populações (BERTRAMS et al., 1981; FIELDER et al., 1981).

Destacam-se ainda na literatura outros estudos de associação do polimorfismo de BF com doenças, tais como com espondilite anquilosante (MIGONE et al., 1978), artrite reumatóide (LANCHBURY; PAL; PAPIHA, 1987; WATZCO; MESSIAS, 1994), pênfigo e penfigóide bolhoso (NISHIMUKAI et al., 1991), paracoccidioidomicose (MESSIAS et al., 1991), esquizofrenia (FANANAS et al., 1992) e glomerulonefrite (WELCH; FRENZKE, 2001). O quadro 2 mostra uma relação de alelos de BF, C2, C3 e C4 associados à diferentes doenças.

QUADRO 2 - ALELOS DE BF, C2, C3 E C4 ASSOCIADOS COM DOENÇAS

ALELO	DOENÇAS	REFERÊNCIAS
BF*S	espondilite anquilosante	MIGONE et al., 1978
BF*F	nefropatia por IgA doença de Alzheimer	RAMBAUSEK et al., 1987 NEMETH et al., 1995
BF*F1	nefropatia membranosa idiopática doença celiaca hanseníase virchowiana diabetes mellitus insulino-dependente diabetes mellitus insulino-dependente	DYER et al., 1980 MALAVASI et al., 1980 MAUFF; HITZEROTH; KLEEGERG, 1983 MISIANO et al., 1989 STANEKOVA et al., 1993
BF*S07	hanseníase virchowiana diabetes mellitus insulino-dependente	MAUFF; HITZEROTH; KLEEGERG, 1983 STANEKOVA et al., 1993
BF SF	doença celiaca artrite reumatóide	MALAVASI et al., 1980 WATZKO; MESSIAS, 1994
C2*Q0	lúpus eritematoso sistêmico lúpus eritematoso sistêmico	FRONEK et al., 1990 LIPSKER et al., 2000
C2*B	retinopatia proliferativa em diabetes	BERTRAMS et al., 1980
C3*F	nefropatia por IgA esquizofrenia vasculite sistêmica osteoartrite e hipertensão em enxaqueca	RAMBAUSEK et al., 1987 FANANAS et al., 1992 FINN et al., 1994 PEROUTKA; PRICE; JONES, 1997
C4A*Q0	doença celiaca diabetes mellitus insulino-dependente hepatite autoimune hepatite autoimune lúpus eritematoso sistêmico esclerose múltipla doença de Alzheimer	RITTNER et al., 1984 SEGURADO et al., 1991 SCULLY et al., 1993 DOHERTY et al., 1994 HONG et al., 1994 FRANCIOTTA et al., 1995 NEMETH et al., 1995
C4A*2	doença de Takaiasu	NUMANO et al., 1989
C4B*Q0	lúpus eritematoso sistêmico paracoccidioidomicose hanseníase virchowiana lúpus eritematoso sistêmico	FIELDER et al., 1983 MESSIAS et al., 1991 MESSIAS et al., 1993 NAVES et al., 1998

Os relatos de associação do polimorfismo de BF com a Doença Celiaca são escassos na literatura (MALAVASI et al., 1980; ALPER et al., 1987; MANNION et al., 1993) e serão abordados no item 3.2.10.

3.2 DOENÇA CELÍACA

A DC consiste em uma enteropatia por sensibilidade ao glúten, caracterizada por um estado de elevada resposta imunológica, tanto celular como humoral, induzida pela ingestão de proteínas do glúten presentes no trigo, centeio, cevada e aveia (MARSH, 1995; CLOT; BABRON, 2000). Atualmente, é considerada resultado de uma complexa interação entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais que explicam o seu amplo espectro de manifestações clínicas (HOULSTON; FORD, 1996; SCHUPPAN, 2000; SOLLID et al., 2001).

O termo *celíaco*, de origem grega (*koiliakós*) é relativo à abdome, ventre, sendo que a primeira descrição clínica detalhada da DC, sob o nome de "afecção celíaca", foi feita por GEE¹, citado por SCHUPPAN (2000). Desde então, muitas descobertas e avanços permitiram uma gradual compreensão dessa enfermidade. DICKE², citado por SCHUPPAN (2000), identificou o papel etiológico do trigo e de outros grãos na DC. O aspecto histológico clássico de atrofia de vilosidades, hiperplasia das criptas e inflamação foi demonstrado em biópsias intestinais obtidas cirurgicamente (PAULLEY, 1954). Logo a seguir, a realização de biópsia peroral do intestino delgado permitiu a obtenção de amostras de mucosa intestinal sem cirurgia, o que revolucionou o diagnóstico e manuseio de uma condição que, com frequência, era fatal.

¹GEE, S. On the celiac affection. St. Bartholomeus Hosp Rep, v.24, p.17-20, 1888.

²DICKE, W. K. **Investigation of the harmful effects of certain types o cereal on patients with celiac disease**. Netherlands, 1950. (Doctoral thesis). University of Utrecht.

A DC hoje é considerada bem mais comum do que se pensava no passado. Do ponto de vista clínico, pode apresentar-se, em sua forma clássica, com má absorção intestinal grave, caracterizada por diarreia crônica, distensão abdominal e déficit de crescimento, ou sob formas monossintomáticas, silenciosas ou latentes (FERGUSON, 1996; HORVATH; MEHTA, 2000). Embora a DC represente uma das causas mais frequentes de diarreia crônica e déficit de crescimento na infância, essa pode ocorrer em qualquer idade (KOTZE, 2001a). Apesar de, usualmente, os sintomas iniciarem já na infância, tem-se observado, cada vez com maior frequência, início mais tardio, às vezes retardado até a vida adulta do indivíduo (ALPER et al., 1987; TRONCONE; GRECO; AURICCHIO, 1996b).

Crianças menores de dois anos de idade com DC apresentam também anorexia, vômitos, distensão abdominal, perda muscular e irritabilidade recorrentes. Após a infância, o quadro clínico da DC é menos típico, passando de uma forma infantil aguda para uma sintomatologia mais moderada. Os sintomas gastrointestinais podem ser menos frequentes, porém os pacientes apresentam retardo de crescimento, perda de peso, anemia por deficiência de ferro, puberdade tardia e atrofia parcial das vilosidades, além de formas assintomáticas ou silenciosas (FERGUSON, 1996; FERGUSON et al., 1998; SOLLID, 2000; CLOT; BABRON, 2000).

O espectro clínico da DC ampliou-se nas últimas décadas. As formas clássicas, caracterizadas por má absorção, atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas, constituem, na realidade, apenas uma ponta do *iceberg* (MÄKI; COLLIN, 1997; COLLIN; KAUKINEN; MÄKI, 1999; HORVATH; MEHTA, 2000).

Alterações hepáticas, articulares, hematológicas, dentárias e neurológicas também têm sido reconhecidas de forma crescente na DC. Além de que, diversas outras doenças estão associadas à DC, tais como deficiência de IgA, aftas recorrentes, diabetes mellitus insulino-dependente, doenças autoimunes da tireóide, artrite reumatóide, síndrome de Sjögren e outras doenças autoimunes. A dermatite herpetiforme, atualmente, é

considerada como manifestação dermatológica da DC, mais do que uma doença associada (TRONCONE; GRECO; AURICCHIO, 1996b; MÄKI; COLLIN, 1997).

Inúmeros aspectos evidenciam as características autoimunes da DC. Destacam-se entre eles: a forma poligênica de herança; a associação com os antígenos HLA; a associação com outras doenças autoimunes; as manifestações extra-intestinais; a infiltração linfocítica na mucosa intestinal, com aumento de linfócitos com receptor TCR $\gamma\delta$ nas células epiteliais da mucosa e na circulação; a presença de auto-anticorpos específicos e de auto-anticorpos associados a outras doenças autoimunes e a resposta à terapia com imunossupressores (LERNER; BLANK; SCHOENFELD, 1996).

Com a introdução e amplo uso dos testes sorológicos de diagnóstico e triagem, formas clinicamente silenciosas e latentes da DC têm sido detectadas em número crescente nas diferentes populações, assim como nos familiares de pacientes celíacos (UNSWORTH; BROWN, 1994; VAZQUEZ et al., 1996; HOGBERG et al., 2003). Considera-se como *silenciosa* aquela forma de DC caracterizada por grave dano de mucosa entérica, porém com ausência de sintomatologia. Já o termo *latente* é aplicado nas situações em que os pacientes têm arquitetura normal das vilosidades intestinais, sob uma dieta habitual com glúten, mas que posteriormente desenvolvem atrofia das vilosidades compatível com DC. Esses pacientes não apresentam, obrigatoriamente, contagem elevada de linfócitos intra-epiteliais, porém a presença de marcadores sorológicos já é preditiva de progressão para a atrofia de vilosidades (TRONCONE et al., 1996a; COLLIN; KAUKINEN; MÄKI, 1999a; KOTZE, 2001a).

3.2.1 Prevalência da Doença Celiaca

A DC ocorre predominantemente em indivíduos da raça branca e raramente afeta nativos africanos, japoneses ou chineses. Apresenta-se com maior frequência em países anglo-saxônicos e nórdicos, embora possa ser considerada de distribuição mundial (HOULSTON; FORD, 1996; ELLIOTT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998). No Brasil,

pelo alto índice de miscigenação da população, a doença já foi descrita inclusive em mulatos. A região sul do país, caracterizada pela colonização européia, apresenta maior frequência da doença em descendentes de alemães, italianos, portugueses, poloneses, ucranianos e espanhóis, entre outros (KOTZE, 2001a).

Considera-se que a prevalência da DC tenha sido subestimada no passado, em parte pelas dificuldades de diagnóstico, mas também devido ao grande número de indivíduos apresentando formas silenciosas ou assintomáticas da doença (VAZQUEZ et al., 1995; TRONCONE et al., 1996a; KING; CICLITIRA, 2000). Em populações da Europa, a taxa de prevalência estimada tem mostrado uma variação de 1:200 a 1:400 em países como Suécia, Irlanda e Itália, até 1:1000 a 1:2000 em outras regiões (CATASSI et al., 1994; STENHAMMAR, 1994; TRONCONE; GRECO; AURICCHIO, 1996b). Nos Estados Unidos, estima-se que a DC afeta 1:250 indivíduos da população (NOT et al., 1998). No Brasil, estudos em doadores de sangue indicaram uma prevalência de 1:681, na população de Brasília, (GANDOLFI et al., 2000) e 1:1000 na de Curitiba (NISHIHARA et al., 2002).

A DC acomete tanto indivíduos do sexo masculino como feminino. Segundo ELLIOTT, MURRAY e WEINSTOCK (1998), a doença afeta mais mulheres do que homens, numa proporção de 1,3:1 à 2,4:1 (MEARIN et al., 1983; TURSI et al., 2001).

3.2.2 O Glúten e a Doença Celiaca

O trigo, o centeio e a cevada são cereais intimamente relacionados (Tribo Triticaceae) e são tóxicos aos pacientes com DC. A toxicidade da aveia, taxonomicamente muito próxima a estes cereais (Tribo Aveneae), é controversa (MÄKI; COLLIN, 1997; HORVATH; MEHTA, 2000; KOTZE, 2001a).

Em cada espécie de cereal, há muitas proteínas de estoque. O glúten é a fração protéica do trigo, centeio e cevada que confere a propriedade de viscoelasticidade e que permite a coesão da farinha. As frações protéicas solúveis em álcool são denominadas

prolaminas, enquanto as insolúveis em álcool são as gluteninas. Aparentemente, são as frações solúveis em álcool (prolaminas), as principais responsáveis pelo desencadeamento ou exacerbação da DC. No trigo, as prolaminas são denominadas gliadinas, enquanto no centeio, cevada e aveia são conhecidas como secalina, hordeína e avenina, respectivamente (GODKIN; JEWELL, 1998; KOTZE, 2001a). Dados recentes sugerem que as gluteninas também podem causar dano à mucosa intestinal (SCHUPPAN, 2000).

Uma característica comum das prolaminas do trigo, do centeio e da cevada é o alto conteúdo de glutamina (>30%) e de prolina (>15%), enquanto as prolaminas não-tóxicas do arroz e milho apresentam um baixo conteúdo desses aminoácidos. A aveia, que detém uma composição intermediária de glutamina e prolina, tem sua toxicidade questionada, e somente uma ingestão excessiva deste cereal seria lesiva à mucosa intestinal (GODKIN; JEWELL, 1998; SCHUPPAN, 2000).

O dano intestinal certamente está relacionado com a quantidade de glúten que é ingerida por indivíduos susceptíveis. Entretanto, a ingestão diária máxima de glúten que é permitida ao paciente celíaco é um tema polêmico, além de que se deve considerar a sensibilidade individual ao glúten (MÄKI; COLLIN, 1997; SCHUPPAN, 2000).

A maioria dos países define sua dieta de glúten de acordo com a Comissão de Código Alimentar da Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS). A FAO permite a inclusão de até 0,3% de proteína de grãos contendo glúten em alimentos rotulados como isentos de glúten. Essa proteína, freqüentemente, é encontrada na forma de amido de trigo e malte. Atualmente, o Padrão Australiano de Alimentação, revisado, estabelece que alimentos comerciais rotulados como isentos de glúten não podem conter glúten detectável. O ensaio imuno enzimático (ELISA) usado para definir esse padrão tem um limite mínimo de detecção de 0,001% de glúten (FAULKNER-HOGG; SELBY; LOBLAY, 1999).

A maioria dos pacientes com DC torna-se assintomática com a dieta isenta de glúten. Quando persiste a sintomatologia gastrointestinal há duas causas principais: 1) os traços de glúten permitidos pelo FAO, e que estão presentes na forma de amido de trigo

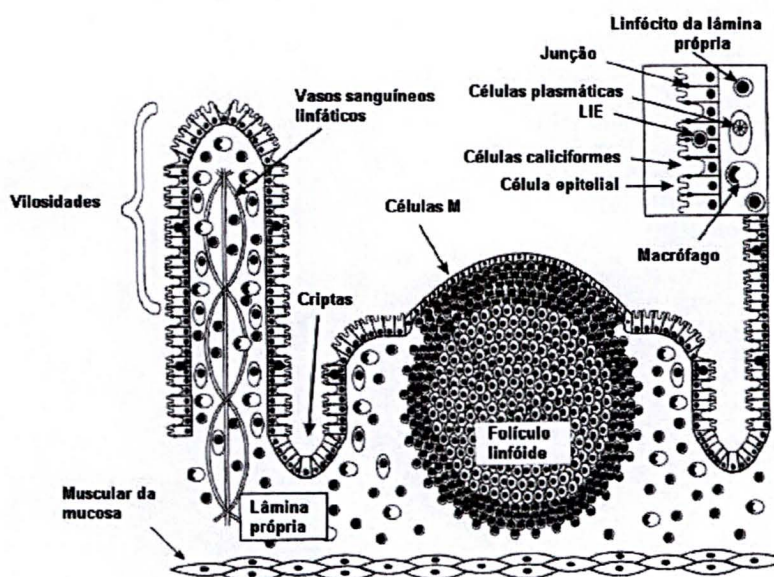
ou malte; 2) as intolerâncias alimentares não relacionadas ao glúten, decorrentes, principalmente, de sensibilidade a outros alimentos ou a alimentos químicos contendo aminas, salicilatos e soja. Nessas situações, sugere-se avaliação de possível coexistência de intolerância alimentar não relacionada ao glúten (FAULKNER-HOGG; SELBY; LOBLAY, 1999).

3.2.3 Patologia da Doença Celíaca

Em um corte histológico normal, o intestino delgado e o cólon apresentam o lúmen central, uma camada de mucosa, uma de submucosa, uma muscular e uma de serosa externa. A mucosa é dividida em camada de células epiteliais, lâmina própria e a muscular da mucosa. A mucosa do intestino delgado, normalmente, tem as vilosidades separadas por criptas, que são constituídas por quatro tipos básicos de células: epiteliais colunares, caliciformes, de Paneth e enteroendócrinas. Os folículos linfóides são frequentes e os maiores, denominados Placas de Peyer, estão presentes no intestino delgado, principalmente no íleo (figura 4). A submucosa, a muscular própria e a serosa estão abaixo da muscular da mucosa (ELLIOTT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998).

A lesão na DC localiza-se na parte proximal do intestino delgado, com dano mais intenso no duodeno e jejuno proximal, afetando áreas nobres de absorção. A mucosa do intestino delgado é que apresenta as alterações mais importantes, estando as outras camadas habitualmente normais à histologia (KOTZE, 2001a). A anormalidade histopatológica clássica caracteriza-se por atrofia das vilosidades, hiperplasia e alongamento das criptas, infiltração linfocítica no epitélio e aumento da densidade de células inflamatórias na lâmina própria (figura 5) (ELLIOTT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998; SOLLID, 2000). Tal aumento decorre da presença de plasmócitos, linfócitos, eosinófilos e polimorfonucleares. Os linfócitos intra-epiteliais (LIE) são, predominantemente, do tipo T, enquanto os linfócitos da lâmina própria são, principalmente, do tipo B (KOTZE; PISANI, 1992).

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MUCOSA INTESTINAL



FONTE: Adaptado de ELLIOTT, MURRAY e WEINSTOCK (1998)

FIGURA 5 - CORTE HISTOLÓGICO DE MUCOSA DUODENAL



NOTA: A-Mucosa entérica normal (HE; 40x)
B-Atrofia de vilosidades e hiperplasia de criptas (HE; 40x)

Vários autores enfatizam o importante aumento no número de LIE na mucosa de celíacos não tratados. Segundo KOTZE (1988), para cada 100 células epiteliais foram encontrados em média 45 LIE, enquanto nos controles saudáveis, observou-se em média 24%.

O dano relacionado ao glúten evolui através de vários estágios de alterações da arquitetura intestinal. BARBIERI et al. (1970) identificaram cinco padrões histológicos principais. O padrão I corresponde à morfologia normal, com vilosidades altas e cilíndricas presentes em toda a extensão dos cortes. O padrão II já corresponde a uma enteropatia inflamatória difusa, com as vilosidades presentes, podendo porém se mostrarem reduzidas ou não em altura. Na lâmina própria, há um nítido aumento da celularidade linfoplasmocitária. O padrão III caracteriza uma enteropatia focal, com um estágio involutivo da mucosa bastante acentuado e a presença de vilosidades por agrupamentos reduzidos, com intervalos por áreas ou focos de total atrofia vilosa (mucosa plana). As vilosidades mostram graus variáveis de redução na altura e nota-se, também, denso infiltrado de LIE na lâmina própria. O padrão IV ou atrófico mostra a típica mucosa plana, com ausência de vilosidades e criptas, ou apenas esboços dessas, em toda a extensão, revelando o máximo grau de involução da mucosa. O padrão V ou misto evidencia áreas da mucosa classificadas dentro de um padrão histológico ao lado de outras que se enquadrariam em outro tipo.

MARSH (1992), propôs um espectro de sensibilidade ao glúten, com seu respectivo repertório de alterações na mucosa, classificando em três estágios distintos e inter-relacionados, além de um quarto tipo ainda controverso. Tais estágios são designados: infiltrativo, hiperplástico, destrutivo e hipoplástico. No Brasil, segue-se, correntemente, os padrões descritos por BARBIERI et al. (1970).

A extensão do intestino lesado na DC varia de um paciente para outro. De modo geral, sabe-se que a gravidade dos sintomas correlaciona-se melhor com essa extensão de intestino afetado do que propriamente com a gravidade da lesão em qualquer segmento do tubo digestivo (MARSH, 1995; KOTZE, 2001a).

3.2.4 Diagnóstico da Doença Celíaca

De acordo com os critérios da Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição (ESPGAN), o diagnóstico da DC baseava-se, até 1990, nos seguintes aspectos: 1) condição permanente de intolerância ao glúten, com sinais e sintomas de má absorção intestinal; 2) lesão inicial caracterizada por atrofia da mucosa do intestino delgado e hiperplasia de criptas; 3) remissão clínica e histológica durante a dieta sem glúten e 4) recidiva clínica e histológica após reintrodução do glúten (MEUWISSE, 1970). Tais critérios dependiam da realização de múltiplas biópsias da mucosa do intestino delgado: uma antes do tratamento, uma na fase de dieta isenta de glúten e outra após o teste com reintrodução do glúten (desafio), levando muitas vezes, a um tempo prolongado para a definição do diagnóstico (KOTZE, 1996; ELLIOTT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998).

Posteriormente, tais critérios foram revisados por WALKER-SMITH et al. (1990). Os autores descrevem o achado inicial como atrofia hiperplásica das vilosidades, com hiperplasia das criptas e epitélio superficial anormal, além de contagem anormal de LIE. Enfatizam ainda, a importância da técnica correta para a biópsia, manejo da amostra e orientação para a secção. O achado característico de atrofia das vilosidades e remissão clínica sob uma dieta isenta de glúten são essenciais. Em pacientes assintomáticos, uma segunda biópsia é necessária para demonstrar a recuperação da mucosa sob dieta isenta de glúten. A presença de anticorpos circulantes característicos de DC e seu desaparecimento com a restrição ao glúten sustentam o diagnóstico.

Por definição, anteriormente, o diagnóstico de DC era excluído em pacientes que tivessem morfologia normal da mucosa intestinal, sob dieta com glúten. Entretanto, o seguimento dos pacientes e a observação da história natural da doença deixou evidente que a sensibilidade ao glúten não poderia mais ser definida e diagnosticada em termos de um padrão específico de lesão de mucosa ou da resposta morfológica de restrição ao glúten. Indivíduos com formas silenciosas e latentes da DC, além de pacientes com dermatite herpetiforme, não seriam diagnosticados desta maneira (MARSH, 1995; MÄKI;

COLLIN, 1997). Corroborando esses aspectos, FERGUSON et al. (1998) ressaltam situações de pacientes com arquitetura normal de mucosa, onde a alta contagem de LIE é a única alteração histológica mensurável, evidenciando enteropatia por sensibilidade ao glúten, inclusive com resposta à exclusão e à reintrodução do glúten na dieta. Nesses casos, ressalta-se a importância de se associar os resultados sorológicos com a sintomatologia do paciente na determinação do diagnóstico e conduta clínica. Atualmente, sabe-se que mucosa normal não exclui o diagnóstico de DC (PICARELLI et al., 1996; KAUKINEN et al., 2001).

Desta forma, apesar da biópsia intestinal permanecer como *padrão ouro* para o diagnóstico da afecção, os rígidos critérios de diagnóstico mudaram nos últimos anos. Os testes sorológicos estabelecidos têm permitido reduzir o número de biópsias e contribuído, efetivamente, para o diagnóstico da DC e monitorização da dieta isenta de glúten (HORVATH; MEHTA, 2000). Pacientes com sintomas leves ou atípicos, bem como familiares de celíacos, indivíduos com deficiência seletiva de IgA, pacientes com diabetes mellitus insulino-dependente, pacientes com síndrome de Down e os casos de DC latente ou silenciosa, contam, atualmente, com os testes sorológicos de triagem, bem menos invasivos do que as biópsias intestinais (CATALDO et al., 1995; TRONCONE et al., 1996a; VAZQUEZ et al., 1996; TALAL et al., 1997; BARDELLA et al., 2001).

Os principais marcadores sorológicos para a DC descritos são os anticorpos anti gliadina (AGA), anti-reticulina (ARA) antiendomísio (EmA) e antitransglutaminase (tTG) (SEAH et al., 1971a; CHORZELSKI et al., 1983; CHALLACOMBE, 1995; DIETERICH et al., 1997).

Os anticorpos antigliadina, identificados em 1962, são investigados, usualmente, pelo método imunoenzimático (ELISA), através da dosagem de AGA-IgA e AGA-IgG no soro dos pacientes. Segundo CHALLACOMBE (1995), os AGA-IgA mostram-se mais específicos para a DC do que os AGA-IgG, que evidenciam maior sensibilidade. Verifica-se ainda alguma restrição na confiabilidade do AGA em relação à idade dos pacientes e à atividade da doença, além dos mesmos serem detectados em outras doenças que não as de

sensibilidade ao glúten (BÜRGIN-WOLFF et al., 1991; MÄKI; COLLIN, 1997; ELLIOTT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998).

Os anticorpos anti-reticulina (ARA-IgA) foram descritos por SEAH et al. (1971), e são detectados através de reação de imunofluorescência indireta (IFI), utilizando como substrato estômago, fígado e rim de rato. Os resultados desse teste diferem de um centro para outro. KOTZE et al. (1999), em pacientes brasileiros, obtiveram apenas 59,4% de sensibilidade para o ARA, comparado a 100% para o EmA, em pacientes celíacos recém diagnosticados e em pacientes em transgressão à dieta.

A pesquisa dos anticorpos antiendomísio (EmA-IgA) representa, atualmente, o melhor teste de triagem para DC, apresentando elevado grau de sensibilidade e especificidade nas várias fases da doença (90-100%), segundo estudos realizados em diferentes populações (CATALDO et al., 1995; PATCHT et al., 1995; SATEGNA-GUIDETTI et al., 1995; BARDELLA et al., 2001; KOTZE et al., 2001b). Esses anticorpos foram descritos, originalmente, por CHORZELSKI et al. (1983) e pertencem primariamente a classe IgA. Sua presença é detectada no soro dos pacientes por método de IFI, e grande parte dos estudos usavam, inicialmente, cortes criostáticos de esôfago de macaco como substrato. Tais anticorpos dirigem-se contra a substância intermiofibrilar da musculatura lisa do esôfago, apresentando um padrão de fluorescência característico (GRODZINSKI, et al., 1995; PATCHT et al., 1995; MC MILLAN et al., 1996).

Os estudos de LADINSER; ROSSIPAL e PITTSCHIELER (1994) e de VOLTA et al. (1995), comparando o uso de esôfago de macaco e de cordão umbilical humano, na pesquisa do EmA-IgA, permitiram a identificação de um substrato menos oneroso e de fácil obtenção. Os autores evidenciaram que o cordão umbilical é rico em fibras de reticulina (endomísio) contornando as fibras de músculo liso na parede da veia e das duas artérias umbilicais, permitindo a detecção dos anticorpos EmA-IgA com segurança, por técnica de IFI (figura 8; item 4.2.3.2 de materiais e métodos).

Diversos estudos comparativos entre os anticorpos AGA, ARA e EmA evidenciam variabilidade na especificidade e sensibilidade dos mesmos, ficando caracterizada a maior

confiabilidade do EmA-IgA. Tais estudos mostram que os níveis de EmA-IgA na circulação são glúten dependentes, refletindo plenamente a atividade da doença. Pacientes sob dieta isenta de glúten, após aproximadamente um ano de tratamento, mostram-se negativos ou com baixos títulos de EmA, evidenciando a importância de um teste não invasivo, não apenas para o diagnóstico, bem como para o seguimento dos pacientes (KAPUSCINSKA et al., 1987; PATCHT et al., 1995; SATEGNA-GUIDETTI, 1995; VOLTA et al., 1995; KOTZE et al., 2001b). CATALDO et al. (1995) evidenciam em seus estudos que os níveis de anticorpos EmA e AGA voltam a se elevar na circulação com o retorno do glúten na alimentação, indicando a reativação da doença.

A triagem em familiares de pacientes celíacos, indivíduos geralmente assintomáticos, tem demonstrado uma variação de 6% à 18% de positividade para os anticorpos EmA. Os estudos histológicos nestes indivíduos demonstram graus variáveis de alterações na mucosa intestinal, com predomínio da presença de linfócitos intra-epiteliais (TRONCONE et al., 1996a; VAZQUEZ et al., 1995, 1996; KORPONAY-SZABO et al., 1998; KOTZE et al., 2003).

Pacientes com deficiência seletiva de IgA têm uma incidência dez vezes maior de DC, e embora essa possa se apresentar na forma silenciosa, a deficiência de IgA parece predispor a doença a um pior curso clínico (MÄKI; COLLIN, 1997). As inúmeras investigações sorológicas em DC enfatizam a necessidade de se dosar os níveis totais de anticorpos IgA circulantes, ao pesquisar-se o EmA-IgA ou AGA-IgA, considerando que pacientes com DC e deficiência seletiva de IgA simultâneas podem apresentar resultados falso-negativos nesses testes (CHALLACOMBE, 1995; RITTMAYER; RHOADS, 1996). Nesses casos, recomenda-se, também, a pesquisa de EmA-IgG (HÄLLSTROM, 1989).

Recentemente, foram descritos os anticorpos contra a enzima transglutaminase tecidual (tTG-IgA) (DIETERICH et al., 1997). De acordo com diferentes autores, a transglutaminase pode ser o principal, se não o único auto-antígeno endomisial alvo envolvido na fisiopatologia da DC (DIETERICH; LAAG; SCHOPPER, 1998; SCHUPPAN; DIETERICH; RIECKEN, 1998; MOLBERG; MCDAM; SOLLID, 2000).

Tais anticorpos são detectados pelo método de ELISA e apresentam alta sensibilidade e especificidade para a DC. Segundo DIETERICH, LAAG e SCHOPPER (1998), a pesquisa do anti-tTG-IgA tende a ser um importante recurso para triagem populacional, por representar um ensaio quantitativo e de fácil execução.

Diversos centros têm realizado estudos comparativos entre a pesquisa dos anticorpos EmA-IgA e anti-tTG-IgA, visando determinar a relação entre os mesmos e, conseqüentemente, a confiabilidade para diagnóstico e monitoramento da doença (GILLET; FREEMAN, 2000; LEVINE; BUJANOVER; REIF, 2000; SARDY; KARPATY; PETERFY, 2000).

Na população brasileira os estudos sorológicos em DC são escassos e incluem a pesquisa de AGA-IgA (ROMALDINI; BARBIERI, 1997; BAHIA et al., 2001), EmA-IgA (KOTZE et al., 2001b) e anti-tTG-IgA (UTIYAMA et al., 2002).

3.2.5 Terapêutica da Doença Celíaca

A única possibilidade terapêutica para a DC constitui-se em dieta isenta de glúten, por toda a vida (FAULKNER-HOGG; SELBY; LOBLAY, 1999; CLOT; BABRON, 2000; SOLLID, 2000). Tal tratamento resulta em recuperação clínica e de mucosa, verificando-se recidivas das manifestações com o retorno do glúten na alimentação (FERGUSON, 1998; KOTZE, 2001a).

A DC não tratada resulta em significativa morbidade e está associada a um aumento de risco de linfoma intestinal, anemia, osteoporose e infertilidade (HOLMES et al., 1989; HOLMES, 2002; KORPONAY-SZABO et al., 1998; MUSTALAHTI et al., 2002b; KOTZE, 2003). De acordo com SCHUPPAN (2000), a DC de longa data não tratada, mesmo se for clinicamente silenciosa, predispõe a outras doenças autoimunes.

Cabe porém ressaltar que, embora o verdadeiro tratamento da DC seja dietético, os diferentes graus de desnutrição, desidratação, carências vitamínicas e de sais minerais podem levar a necessidade de reposições, através de nutrição parenteral e/ou por via oral,

de acordo com os dados clínicos e laboratoriais de cada paciente (KOTZE, 2001a). Além do suporte nutricional, terapia imunossupressora pode trazer melhora em casos muito específicos de pacientes gravemente comprometidos, que não respondem à dieta isenta de glúten (LERNER; BLANK; SHOENFELD, 1996; ELLIOTT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998), embora raramente essa seja necessária (MÄKI; COLLIN, 1997).

3.2.6 Doenças Autoimunes Associadas à DC

A freqüente superposição das doenças autoimunes órgão-específicas entre si é um fato (FIKE, 1997b). A associação da DC com outras doenças autoimunes encontra-se bem estabelecida e tem sido relatada por diversos autores. Doenças endócrinas são observadas com freqüência em pacientes com DC, destacando-se o aumento na prevalência de diabetes mellitus insulino-dependente (VITORIA et al., 1998; SUMNIK et al., 2000), doenças autoimunes da tireóide (SATEGNA-GUIDETTI et al., 1998; VELLUZZI et al., 1998) e doença de Addison (KAUKINEN et al., 1999). Protocolos de triagem e relatos de casos também têm evidenciado a associação da DC com hepatite crônica autoimune (SJOBERG; LINDGREN; ERIKSSON, 1997; VOLTA et al., 1998), cirrose biliar primária (KINGHAM; PARKER, 1998; SORENSEN et al., 1999) e lúpus eritematoso sistêmico (VARKEL et al., 1989; MUKAMEL et al., 1994), entre outras (VILPPULA; AINE, 1984).

O envolvimento de mecanismos imunológicos e a presença de fatores genéticos em comum, envolvendo em especial as moléculas HLA de classe I e classe II, têm sido assinaladas como possíveis causas para tais associações (HODGES et al., 1991; KAUKINEN et al., 1999; DETLEF, 2000; SUMNIK et al., 2000; TOSCANO et al., 2000).

Tem-se demonstrado que o aparecimento de uma doença autoimune freqüentemente predispõe ao desenvolvimento de outras (VILPPULA; AINE, 1984; SHEEHAN; STANTON-KING, 1993; LERNER; BLANK; SHOENFELD, 1996).

Diferentes estudos têm evidenciado uma maior prevalência de doenças autoimunes associadas à DC com o aumento da idade do paciente ao diagnóstico, estando esse fato diretamente relacionado ao tempo de exposição ao glúten (VENTURA; MAGAZZU; GRECO, 1999).

Algumas doenças de caráter autoimune em pacientes celíacos podem melhorar, ou mesmo ter sua prevalência diminuída, sob dieta isenta de glúten (VITORIA et al., 1998; TOSCANO et al., 2000). Por outro lado, a detecção e o tratamento precoce da DC em doenças autoimunes, como as tireoidites, são efetivos na eliminação de sintomas e têm um papel protetor ao prevenirem complicações da intolerância ao glúten nesses pacientes, além de limitar o risco do desenvolvimento de outras doenças autoimunes (CUOCO et al., 1999; BERTI et al., 2000).

Desta forma, recentemente, inúmeros centros têm estabelecido programas de triagem de diferentes auto-anticorpos, visando caracterizar a presença de doenças autoimunes concomitantes à DC ou o inverso. Verifica-se, porém, que em geral tais estudos são conduzidos com um número limitado de auto-anticorpos ou buscam a associação direta com uma só afecção (KINGHAM; PARKER, 1998; VELLUZZI et al., 1998; SUMNIK et al., 2000).

Embora sejam inúmeros os estudos de triagem para detecção de formas latentes ou silenciosas da DC em familiares de celíacos, a investigação de outros auto-anticorpos e associação com doenças autoimunes têm sido restritas, apesar de ser reconhecida a maior prevalência de doenças autoimunes em famílias geneticamente predispostas (HODGES et al., 1991; BOUDRAA et al., 1996).

No Brasil, UTIYAMA et al. (2001) realizaram um amplo perfil de auto-anticorpos em pacientes celíacos e familiares, dando ênfase à avaliação e ao seguimento dos indivíduos positivos, para esclarecer a relevância clínica dos achados.

Alguns auto-anticorpos, como os avaliados no presente estudo, mostram uma importante associação com determinadas doenças autoimunes. Pode-se citar os anticorpos antimúsculo liso, na hepatite crônica autoimune do tipo I; os anticorpos antimitocôndria,

na cirrose biliar primária; os anticorpos anti-LKM, na hepatite crônica autoimune do tipo II; os anticorpos anticélulas gástricas parietais, na gastrite atrófica e na anemia perniciosa; os anticorpos antimicrosossomais tireoideanos (antiperoxidase), nas tireoidites autoimunes; os anticorpos anticélulas das ilhotas (ICA) no diabetes mellitus insulino-dependente; os anticorpos antinucleares e anti-DNA no lúpus eritematoso sistêmico, entre outros (RIZZETO; SWANA; DONIACH, 1973; BIGAZZI; ROSE, 1984; FIKE, 1997a, 1997b).

Cabe porém ressaltar, que o dado isolado de positividade para um auto-anticorpo não vai, necessariamente, conferir o diagnóstico de uma doença autoimune. Além de que, muitos desses anticorpos podem surgir precocemente na circulação do paciente, até anos antes de qualquer manifestação clínica. Portanto, somente a associação entre marcadores sorológicos, dados clínicos, laboratoriais e exames complementares é que vão levar ao diagnóstico definitivo de uma determinada doença autoimune.

3.2.7 Genética da Doença Celíaca

A DC representa uma forte condição hereditária (KING; CICLITIRA, 2000), constituindo-se em uma doença multifatorial, complexa, envolvendo tanto componentes genéticos como ambientais na sua etiopatogenia (ZHONG et al., 1996). Cada fator genético de risco, separadamente, pode ser freqüente na população geral, e é a combinação de alguns desses e suas interações com os fatores ambientais, que induzem à patologia intestinal (CLOT; BABRON, 2000).

Estudos de segregação em famílias têm sugerido uma importante predisposição genética à DC, caracterizada por uma prevalência de 8% a 18% entre os familiares de primeiro grau (HOUSTON, FORD, 1996; MÄKI; COLLIN, 1997; SCHUPPAN, 2000), além de uma taxa de concordância variando de 70% a 100% entre gêmeos monozigóticos, comparado com 20% entre os gêmeos dizigóticos (SOLLID; THORSBY, 1993; CLOT; BABRON, 2000). A diferente variação entre os familiares pode resultar não somente da heterogeneidade genética e ambiental entre as populações, como também do critério

diagnóstico utilizado nos estudos. A concordância incompleta entre os pares de gêmeos monozigóticos sugere que fatores ambientais adicionais estejam envolvidos na patogênese da doença, além de que nem sempre todos os pares de irmãos estudados têm a monozigose comprovada. Em alguns, o seguimento ainda é insuficiente para se estar certo que a doença não se desenvolverá em um estágio mais tardio (HOUSTON; FORD, 1996).

Mc DONALD, DOBBINS e RUBIN (1965), baseados em estudos de famílias e utilizando biópsias de intestino delgado, foram os primeiros a sugerir uma herança autossômica dominante para a DC, com a participação de genes de penetrância incompleta. Desde então, a busca de fatores genéticos de risco envolvidos na etiologia da DC tem sido constante e intensiva, marcando décadas de avanços e descobertas (EK et al., 1978; SOLLID et al., 1989; GRECO et al., 1998a; LOPEZ-VAZQUEZ et al., 2002).

PENA et al. (1978), em um estudo imunológico em famílias, propuseram que dois *loci* distintos, não associados, estariam envolvidos na etiologia da DC, um herdado de forma dominante e outro recessiva. Os autores sugeriram que o *locus* dominante estava ligado ao HLA-DR3, enquanto aquele herdado recessivamente não estava ligado ao HLA. Essa proposta foi confirmada por alguns autores e contestada por outros (GREENBERG; HODGE; ROTTER, 1982a; GREENBERG; LANGE, 1982b; MEARIN et al., 1983), sendo esses aspectos controversos até os dias de hoje (ZHONG et al., 1996; HOUSTON; FORD, 1996). PENA e WIJMENGA (2001) defendem o conceito de que o HLA-DQ atua como gene dominante e que um segundo *locus*, dentro do MHC, está também envolvido na predisposição às enteropatias por sensibilidade ao glúten nas populações dos países baixos.

3.2.7.1 Associação com o sistema HLA

A importante associação entre os antígenos HLA e a DC, bem como o papel destas moléculas como fator genético de susceptibilidade à doença encontram-se bem estabelecidos (SOLLID; THORSBY, 1993; HOUSTON; FORD, 1996). A primeira

associação descrita entre DC e o sistema HLA foi com as moléculas de classe I, HLA-A1 e HLA-B8 (STOKES et al., 1972). Importantes associações, detectadas em diferentes populações, foram descritas desde então, e algumas dessas encontram-se relacionadas no quadro 3.

QUADRO 3 - ASSOCIAÇÕES ENTRE HLA E DC EM DIFERENTES POPULAÇÕES

HLA	POPULAÇÕES	REFERÊNCIAS
A1, B8	Caucasóides; Reino Unido	STOKES et al., 1972
B8	Brasil	KOTZE; FERREIRA, 1979
DR3	Noruega	EK et al., 1978
DR7	Caucasóides	BETUEL et al., 1980
DR3/DR7; DR5/DR7	Espanha	MEARIN et al., 1983
DR5/DR7	Itália	TRABACE et al., 1984
B8-DR3	Caucasóides	ALPER et al., 1987
DQ2	Itália	TOSI et al., 1983
DQ2 (DQA1; DQB1)	Noruega	SOLLID et al., 1989
DQ2		
(DQA1*0501/DQB1*0201)	Noruega	PLOSKI et al., 1993
DQ8	Noruega	SOLLID et al., 1989
	Espanha	SPURKLAND et al., 1992
DQ2,B18,DR3	Itália	CONGIA et al., 1992
DPB4.2/ BPB3	Itália	BUGAWAN et al., 1989
DPB1/ DPB3	Caucasóides	KAGNOFF et al., 1989
DPB1*0101	Finlândia	POLVI; MAKI; PARTANEN, 1997
DR-53	Itália, Tunísia	CLOT et al., 1999a
DRB1*03; DRB1*07/		
DQB1*02	Brasil	SILVA et al., 2000

Dentre as doenças complexas, a DC é a que apresenta a mais forte associação com HLA, sendo que aproximadamente 90-95% dos casos, em população caucasóide, estão associados com o HLA-DQ2 (alelos DQA1*0501 e DQB1*0201) e a maioria restante com o HLA-DQ8 (DQA1*0301 e DQB1*0302) (SOLLID et al., 1989). Entretanto, apesar da alta prevalência de HLA-DQ2 na população sadia (25-30%), sabe-se que apenas uma pequena proporção destes indivíduos desenvolvem a DC (SOLLID; THORSBY, 1993; MÄKI; COLLIN, 1997; GODKIN; JEWEL, 1998; SCHUPPAN, 2000). Esse fato, aliado à diferença na taxa de concordância da doença entre gêmeos monozigóticos e aos resultados de estudos com pares de irmãos afetados, mostrando uma concordância de 30 a 50% entre irmãos HLA idênticos, torna os genes não associados ao HLA determinantes mais fortes de susceptibilidade à DC do que aqueles ligados ao HLA (MARSH, 1992; HOUSTON; FORD, 1996; BEVAN et al., 1999; CLOT; BABRON, 2000).

De acordo com HOUSTON e FORD (1996) tais genes poderiam agir, teoricamente, de forma aditiva ou multiplicativa em conjunto com HLA. Entretanto, o risco familiar visto em irmãos de celiacos e em gêmeos monozigóticos é mais compatível com o modelo multiplicativo, já que um modelo aditivo simples violaria a complexa relação matemática de risco relativo que existe entre irmãos, entre pais e filhos e entre gêmeos monozigóticos, demonstrada por RISCH (1990). Os estudos de BEVAN et al. (1999) também falam a favor de um modelo multiplicativo para a interação entre as duas classes de genes.

Estudos de associação da DC com genes situados entre os *loci* DP e DQ, tais como os que codificam as moléculas TAP (transportador de peptídeos antigênicos) e LMP (protease multifuncional) (COLONNA et al., 1992; POWIS et al., 1993; DJILALI-SALAH et al., 1994), bem como os genes da região de classe I, como o do microsatélite D6S2223 (LIE et al., 1999) e o gene MICA, expresso principalmente em enterócitos, (LOPEZ-VAZQUEZ et al., 2002), representam uma constatação de que muitos genes dessa região ainda estão por ser identificados e que a busca de marcadores envolvidos na susceptibilidade e na patogenia da DC ainda não se esgotou.

3.2.7.2 Os genes de classe III do MHC

Estudos recentes têm sugerido que além da forte influência dos genes do MHC de classe II, também os genes da região de classe III podem apresentar importante papel na susceptibilidade à DC.

Entre os genes localizados nessa região encontra-se o gene que codifica o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), citocina de atividade pró-inflamatória e imunomoduladora, com importante papel na patogênese das doenças imunes associadas ao MHC, tais como a DC. Embora alguns estudos iniciais mostrassem associação do polimorfismo de TNF com a DC, havia contradições quanto a dependência desta associação com HLA DQB1*0201 (Mc MANUS et al., 1996a, 1996b). Investigações mais recentes evidenciaram um significativo aumento da frequência do alelo TNF-308A (TNF-E), na DC, independente dos alelos DRB1*0301, DQA1*0501, DQB1*0201 (DE LA CONCHA et al., 2000), o qual, possivelmente, está relacionado com a gravidade e com as características clínicas da doença (PENA; GARROTE; CRUSIUS, 1998).

Outros estudos (PARTANEN et al., 1993) mostraram significativa diferença na frequência dos dois alelos principais da proteína de choque térmico (HSP70-2) em pacientes celíacos, quando comparados com indivíduos normais e com os familiares não-celíacos. Essa associação, entretanto, pode ser resultado de uma forte ligação entre o alelo HSP70-2 (alelo L) e o haplótipo HLA B8-DR3.

Em relação ao polimorfismo das proteínas do sistema complemento, codificadas por genes da região de classe III do MHC (BF, C2, C4A e C4B), são raros os relatos de associação com a DC (MALAVASI et al., 1980; ALPER et al., 1987; MANNION et al., 1993; BRAI; ACCARDO; BELLAVIA, 1994). A associação entre o polimorfismo genético do BF e a DC será tratada no item 3.2.10.

PENA, GARROTE e CRUSIUS (1998) ressaltam que os genes de classe III do MHC codificam fatores que participam na modulação da resposta imune e que podem determinar a heterogeneidade clínica da DC. Os autores sugerem que as variantes desses

genes desempenham um papel modulatório diferenciado no controle da inflamação e que a combinação desses com alelos de associação primária (HLA-DQ) podem determinar a evolução clínica da doença.

3.2.7.3 Associação com os genes não-HLA

As diferenças nas taxas de concordância de DC entre gêmeos monozigóticos e entre irmãos HLA idênticos, aliadas à constatação de que apenas uma pequena proporção de indivíduos que têm a molécula HLA-DQ ($\alpha 1^*0501$, $\beta 1^*0201$) apresentam a doença, deixam evidentes o envolvimento de genes não-HLA e dos fatores ambientais no desenvolvimento da DC (SCHUPPAN, 2000; CLOT; BABRON, 2000). Considerando que a DC tem sido atribuída a uma anormalidade na resposta imune mediada por células T, frente às proteínas do glúten, outros genes que também influenciam essa resposta poderiam, potencialmente, contribuir na susceptibilidade à DC. Dentre esses, podem-se incluir os genes de receptores de células T (TCR); os genes geradores de peptídeos, que codificam moléculas envolvidas no processamento e transporte dos peptídeos para os compartimentos HLA no interior da célula; além dos genes imunomoduladores, como aqueles que codificam moléculas de adesão celular, citocinas e receptores de citocinas (SOLLID; THORSBY, 1993; HOULSTON; FORD, 1996).

Alguns estudos de associação entre a DC e esses genes, tais como TCR (ROSCHMANN et al., 1993), ou TAP1 e TAP2 (POWIS et al., 1993; DJILALI-SAIAH et al., 1994), não caracterizaram associação ou, quando essa ocorreu, era secundária a uma associação primária com alelos de DR e DQ.

Outro potencial gene candidato é o CTLA-4 (gene associado ao linfócito T citotóxico) no cromossoma 2. Esse codifica uma molécula de linfócito T, que fornece sinal negativo para ativação de célula T e que media apoptose da mesma. Embora tenham sido encontradas associações positivas entre CTLA-4 e DC em estudos com populações francesas e escandinavas, resultados discordantes com pacientes da Itália e Tunísia

sugerem diferenças na região CTLA-4 de uma população para outra, tanto no aspecto de fator de risco como na força de desequilíbrio de ligação (CLOT et al., 1999b; CLOT; BABRON, 2000).

ALDERSLEY et al. (2000) não evidenciaram associação entre o polimorfismo gênico da transglutaminase tecidual (tTG) e a DC.

Recentemente, as investigações voltadas para identificar os genes não-HLA de susceptibilidade à DC têm sido, principalmente, através de análises com famílias nucleares, envolvendo estudos de rastreamento do genoma, usando métodos não paramétricos. As evidências mais fortes de ligação com *locus* não-HLA e DC foram no cromossoma 6p23, distinto da região HLA (ZHONG et al., 1996), no cromossoma 15q26 (HOULSTON et al., 1997) e nos cromossomas 5q e 11q (GRECO et al., 1998a; NALUAI et al., 2001), em pacientes da Irlanda, Inglaterra, Itália e Escandinávia, respectivamente. Embora nesses estudos ocorra concordância de dados em relação a algumas reações mais fracas, as diferenças obtidas sugerem que o componente genético da DC é diferente nas diversas populações estudadas.

3.2.8 Imunopatogenia da Doença Celíaca

Os conhecimentos da patogênese da DC tiveram grandes progressos nos últimos anos (SCHUPPAN, 2000). Componentes humorais e celulares da resposta imunológica participam, ativamente, no processo de lesão da mucosa intestinal (ELLIOTT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998; FERGUSON et al., 1998; SOLLID, 2000).

É de particular relevância o infiltrado de células T na lâmina própria e no epitélio das vilosidades da mucosa intestinal de pacientes celíacos. Predominam os linfócitos intra-epiteliais citotóxicos ($CD8^{+}$), com receptores TCR $\alpha\beta$ e sua contagem correlaciona-se com o grau de lesão da mucosa. Na lâmina própria inflamada predominam plasmócitos e linfócitos T $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$, além de neutrófilos, mastócitos e eosinófilos. Evidências indicam que células T $CD4^{+}$ com receptores TCR $\alpha\beta$, na lâmina própria, podem iniciar o

processo de doença. Embora não esteja totalmente esclarecida a participação das células TCR $\gamma\delta$ na patogênese da DC, essas estão aumentadas nos pacientes com doença ativa e em remissão, e nos familiares de primeiro grau (SOLLID; THORSBY, 1993; LUNDIN et al., 1997; ELLIOTT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998).

Em pacientes não tratados, a presença de imunoglobulinas (IgA e IgM) na mucosa intestinal e de depósitos subepiteliais de complemento (HALSTENSEN et al., 1992), assim como a secreção de citocinas pelos LIE, particularmente o interferon- γ (IFN- γ), induzindo maior expressão de moléculas HLA de classe II nas células epiteliais intestinais e nos macrófagos, vêm reforçar a participação da resposta imunológica na patogenia da DC (ELLIOTT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998; HORVATH; MEHTA, 2000).

Atualmente, sabe-se que a gliadina inicia o dano na mucosa intestinal que envolve todo um processo imunológico em indivíduos geneticamente predipostos (DIETERICH et al., 1997; GODKIN; JEWELL, 1998). A constatação da existência de anticorpos (IgA) contra o endomísio como indicação específica de DC já sugeria que esses possuíam um ou mais antígenos alvos com um papel fundamental na patogenia da doença. DIETERICH et al. (1997) identificaram a transglutaminase tecidual (tTG) como o principal auto-antígeno da DC.

A tTG é uma enzima intracelular encontrada em diferentes tipos de células como fibroblastos, leucócitos, células endoteliais de vasos sanguíneos, células de músculo liso e de mucosas. Essa tem sido associada a várias doenças, incluindo distúrbios neuronais, câncer, infecção por HIV, doenças inflamatórias intestinais, diabetes mellitus, cirrose hepática, catarata e várias doenças autoimunes (MOLBERG; McADAM; SOLLID, 2000). Na DC, a tTG tem sido detectada em todas as camadas da parede do intestino delgado, com predomínio de expressão na submucosa (KOOP; ILCHMANN; IZZI, 2000; MOLBERG; McADAM; SOLLID, 2000). Essa enzima catalisa a formação de pontes isopeptídicas entre resíduos de glutamina e lisina. Normalmente intracelular, a tTG é liberada das células durante a inflamação ou injúria e promove a ligação cruzada de certas

proteínas da matriz extracelular, estabilizando assim o tecido conjuntivo (SCHUPPAN, 2000).

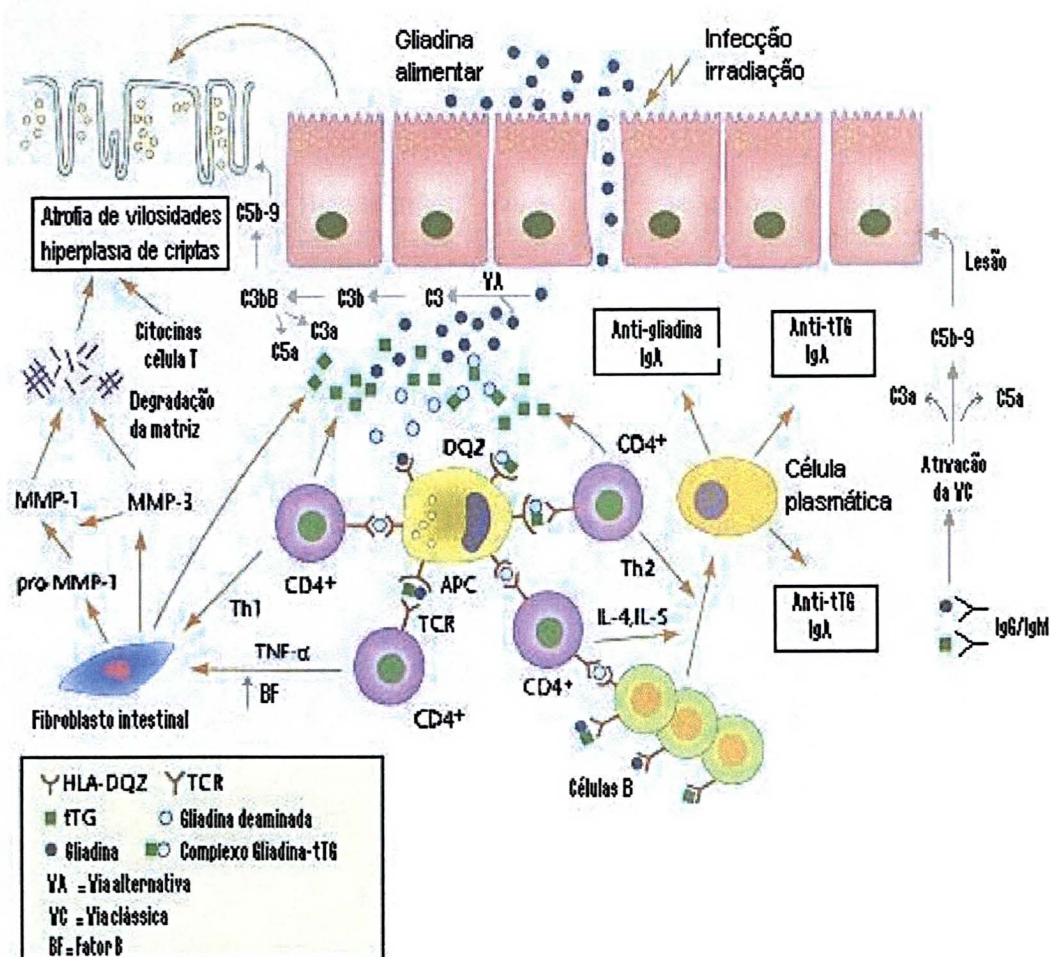
Enzimas do lúmen intestinal digerem o glúten em peptídeos que são expostos à tTG da mucosa. Esta modifica especificamente os peptídeos do glúten, através da desaminação de certos resíduos de glutamina, convertendo-os em moléculas de ácido glutâmico, carregadas negativamente. Esses resíduos, devido à sua carga negativa, ligam-se com maior eficiência às moléculas HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 das células apresentadoras de antígenos (APC), e induzem a uma intensa resposta proliferativa de clones de linfócitos T CD4⁺ gliadina-específicos (LUNDIN et al., 1997; MOLBERG; McADAM; SOLLID, 2000; SCHUPPAN, 2000).

Recentemente, SHAN et al. (2002) identificaram um peptídeo de 33 aminoácidos (33 *mer-peptide*), com três epítomos distintos, sugestivo de ser o iniciador primário da resposta inflamatória ao glúten em pacientes celíacos. Esse é resistente às proteases gástricas, pancreáticas e intestinais e representa um substrato altamente específico da enzima tTG.

Os linfócitos B podem ser preferencialmente estimulados porque também atuam como APC, expondo os peptídeos de gliadina desaminados aos linfócitos T específicos (SCHUPPAN, 2000).

Tanto os peptídeos derivados da gliadina, como variantes da gliadina desaminados pela tTG ou complexos gliadina-tTG, são exibidos por APC através de moléculas HLA-DQ2 ou DQ8. A mucosa intestinal de pacientes com DC apresenta uma população de células T CD4⁺ que reconhecem, através do receptor TCR, esses complexos de peptídeos ligados ao HLA, emitindo uma resposta do tipo Th1 e/ou do tipo Th2, com conseqüente secreção de citocinas (SOLLID, 2000). As citocinas da resposta Th1 (primariamente TNF α) induzem os fibroblastos intestinais à liberação das metaloproteinases da matriz (MMP-1 e MMP-3) que degradam o colágeno fibrilar (MMP-1), glicoproteínas da matriz extracelular e proteoglicanos (MMP-3). Em adição, a MMP-3 pode superativar a MMP-1, ambas exercendo um papel central no processo de atrofia das vilosidades e hiperplasia das

FIGURA 6 - RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA DC



FONTE: Adaptado de SCHUPPAN, DIETERICH e RIECKEN (1998)

criptas. A resposta do tipo Th2 promove maturação e expansão de plasmócitos que produzem, então, anticorpos da classe IgA contra gliadina, tTG e contra complexos gliadina-tTG (figura 6) (SCHUPPAN; DIETERICH; RIECKEN, 1998; SCHUPPAN, 2000).

De acordo com SCHUPPAN (2000), a exposição precoce do sistema imunológico imaturo de crianças à gliadina é um co-fator proeminente para o início da manifestação clínica da doença, provavelmente desviando o sistema imunológico em direção a uma resposta tipo Th1.

Os anticorpos específicos anti-tTG contribuem na patogênese da doença ao comprometerem a diferenciação do epitélio das vilosidades intestinais. Estudos *in vitro* mostram que esses anticorpos, ao se ligarem à tTG, inibem sua atuação na ativação do TGF- β (fator de transformação do crescimento β), fundamental para a diferenciação dos enterócitos (SCHUPPAN; DIETERICH; RIECKEN, 1998). Apesar desse fato e do seu grande valor no diagnóstico da DC, é possível que seu papel não seja absolutamente decisivo na patogenia da doença, já que esses são encontrados com grande frequência na DC latente, nos familiares de primeiro grau de pacientes celíacos, além da ocorrência da DC em indivíduos com deficiência de IgA ou com hipogamaglobulinemia (WEBSTER et al., 1981; RITTMEYER; RHOADS, 1996).

Diferentes evidências têm demonstrado a importante participação do sistema complemento na lesão celíaca (HALSTENSEN et al., 1992). De acordo com FERGUSON et al. (1998), o dano gerado pela ativação do complemento, através dos complexos imunes, coexiste com a resposta imune celular em pacientes celíacos não tratados e pode representar o principal fator responsável pelas alterações na lâmina própria, pela redução na altura dos enterócitos e pela desorganização das micro vilosidades intestinais. Os antígenos envolvidos nestes complexos imunes incluem o glúten, outros alimentos e os auto-antígenos.

Os estudos de UNSWORTH et al. (1993) reforçam as evidências da participação do complemento na patogenia da DC, ao demonstrarem que extratos do glúten do trigo e suas subfrações são potentes ativadores da via alternativa do sistema complemento. Esse fato corrobora as evidências do rápido aumento na permeabilidade da mucosa intestinal após exposição ao glúten e com o intenso afluxo de diferentes células inflamatórias na lâmina própria, e será melhor caracterizado no item a seguir (ELLIOTT, MURRAY; WEINSTOCK, 1998).

3.2.9 O Sistema Complemento na Doença Celíaca

São inúmeros os estudos que têm demonstrado que a ativação do sistema complemento, em resposta ao glúten alimentar na mucosa intestinal, pode representar um importante papel na patogênese da DC (MOHAMMED et al., 1976; GALLAGHER et al., 1989; HALSTENSEN et al., 1992; UNSWORTH et al., 1993).

Em pacientes celíacos não tratados, tem-se observado uma redução significativa nos níveis séricos dos componentes C3 e C4 (BOOTH; PETERS; DOE, 1977; TEISBERG et al., 1977), assim como de BF (MANNION et al., 1993). Além da presença de produtos de ativação de C3 e de BF, sugerindo a ativação da via alternativa (TEISBERG et al., 1977; CEFALO et al., 1989). Tais aspectos, freqüentemente, não são observados em pacientes sob dieta isenta de glúten.

Os estudos de BRINCH et al. (1980), avaliando o metabolismo de C3 em pacientes celíacos, sugerem que o complemento é continuamente ativado na maioria dos pacientes não tratados, possivelmente devido à formação de complexos imunes (CI) na mucosa intestinal.

A presença de CI circulantes em pacientes celíacos não tratados tem sido observada por diferentes autores (MOHAMMED et al., 1976; BOOTH et al., 1977; LAVO et al., 1991). De acordo com os estudos de MOHAMMED et al. (1976), tais complexos, detectados em 100% dos pacientes com DC e com dermatite herpetiforme, representam uma consequência do dano tecidual e não uma causa primária. Os níveis diminuídos de C3 e C4 sugerem a ativação das vias clássica e alternativa nessas doenças. Os estudos de LAVO et al. (1991) demonstram valores elevados de CI circulantes contendo C3, IgG e IgA nos pacientes com DC e dermatite herpetiforme, quando comparados com os controles.

Depósitos de complemento, IgM e IgA extracelular, na zona de membrana basal e na lâmina própria da mucosa jejunal, foram demonstrados em vários estudos, comparando pacientes tratados e não tratados, embora tenham sido evidenciadas algumas

discordâncias entre os autores com relação a classe de imunoglobulina envolvida (BOOTH; PETERS; DOE, 1977; LANCASTER-SMITH; JOYCE; KUMAR, 1977; HALSTENSEN et al., 1992). SCOTT, SCOTT e LOSOWSKY (1977) detectaram, predominantemente, IgA extracelular e C3 na zona de membrana basal e na lâmina própria da mucosa de pacientes celíacos não tratados. Esses sugeriam, na ocasião, que uma reação local ao glúten ou a produtos desse, envolvendo IgA e complemento poderia, pelo menos parcialmente, ser responsável pelo dano progressivo da mucosa nos pacientes não tratados, bem como pelo dano agudo conseqüente ao reteste em pacientes tratados. A detecção de IgM e IgG na zona de membrana basal e lâmina própria, observada por outros autores, sugerem mecanismos similares, com ativação do complemento (BOOTH; PETERS; DOE, 1977; LANCASTER-SMITH; JOYCE; KUMAR, 1977; HALSTENSEN et al., 1992). A presença de IgG representaria uma resposta secundária aos auto-antígenos, subseqüente ao dano agudo causado pelo glúten, contribuindo na continuidade da lesão da mucosa, por ativação da via clássica do complemento.

Esses achados sugerem que, além da resposta imunológica celular, a DC pode representar um modelo intestinal de doença por CI, na qual um antígeno derivado do glúten, passando através da mucosa, reage com anticorpos formados localmente no intestino, ativando o complemento e promovendo uma reação inflamatória local. Essa hipótese é compatível com o rápido aumento da permeabilidade da mucosa intestinal e com o intenso afluxo de diferentes células inflamatórias na lâmina própria, observada em pacientes celíacos não tratados ou reexpostos ao glúten.

Corroborando esses fatos, estudos imunohistoquímicos de biópsias de intestino delgado de pacientes celíacos recém diagnosticados e não tratados, ou parcialmente tratados, mostram também depósitos subepiteliais do complexo terminal do complemento (MAC ou C5b-9), com uma intensidade de reação diretamente proporcional aos níveis de anticorpos séricos contra o glúten (IgG e IgM), ao número de células da mucosa produtoras de IgG e ao grau de atrofia das vilosidades. Depósitos similares não foram observados em pacientes tratados com sucesso e no grupo controle. No reteste com

glúten, observou-se um aumento dos depósitos de C5b-9 subepiteliais, além de deposição de C3b, sugerindo uma ativação recente do complemento (HALSTENSEN et al., 1992). Previamente, GALLAGHER et al. (1989) também detectaram quantidade aumentada de C3 na lâmina própria de biópsias de pacientes não tratados e depósitos de C5b-9 apenas nas glândulas de Brünner, na submucosa intestinal.

Em pacientes com mucosa normal após dieta de glúten, foram observadas anormalidades histopatológicas quatro a oito horas após reintrodução do glúten (BOOTH et al., 1977), com aumento de IgA e IgM extracelular na lâmina própria e nas células epiteliais, além de depósitos de C3 em algumas biópsias (LANCASTER-SMITH; JOYCE; KUMAR, 1977). Além disso, outros autores detectaram também diminuição significativa nos níveis séricos de C1 e BF após quatro horas da administração do glúten em crianças celíacas tratadas (BOSCH et al., 1980).

A ocorrência da DC em pacientes com hipogamaglobulinemia (WEBSTER et al., 1981) sugere um relevante papel para uma via de ativação do complemento além da clássica no processo da doença. Os achados preliminares de MASSEY, CAPNER E MOWBRAY (1977) de que frações do glúten ativam a via alternativa do complemento quando adicionados ao soro humano normal foram, subsequente, confirmados por UNSWORTH et al. (1993). Os autores demonstraram que subfrações do glúten do trigo são ativadores tão potentes da via alternativa quanto partículas de zymosan. Os resultados obtidos foram os mesmos tanto quando se usou soro humano normal, soro de pacientes com DC, com dermatite herpetiforme ou com hipogamaglobulinemia como fontes de complemento. Em estudos anteriores, UNSWORTH et al. (1981) mostraram que as proteínas do trigo (gliadinas) ligam-se, seletivamente, à reticulina (endomísio) em biópsias humanas. Os autores propõem, baseados nos achados recentes, que os peptídeos de glúten, uma vez ligados à reticulina intestinal, ativam o complemento, causando lesão tecidual local com auto-sensibilização da reticulina e seqüencial reação mediada por células T (UNSWORTH, et al., 1993). A ativação do complemento por este mecanismo seria rápida e representa uma explicação plausível para a resposta clínica imediata

observada três horas após a reintrodução do glúten (reteste) em pacientes celíacos tratados, inclusive a nível de infusão na mucosa retal (MARSH, 1995; KOTZE, 2001a).

Corroboram esses dados os níveis significativamente diminuídos de BF, encontrados por MANNION et al. (1993) nos pacientes em relação a controles sadios, reforçando o papel da ativação da via alternativa na lesão da mucosa intestinal. Segundo os autores, os níveis diminuídos de C3, C4 e BF encontrados podem indicar uma ativação progressiva do complemento em pacientes celíacos.

3.2.10 Polimorfismo de BF na Doença Celíaca

São raros os relatos de associação entre o polimorfismo de BF e a DC. Destacam-se, entre esses, os achados de ALPER et al. (1987), demonstrando aumento na frequência dos haplótipos [HLA-B8, DR3, BF*S, C2*C, C4A*Q0, C4B*1] e [HLA-B44, DR7, BF*F, C2*C, C4A*3, C4B*1] em pacientes celíacos caucasóides, bem como os resultados obtidos por MANNION et al. (1993) com aumento do haplótipo [HLA-B8, DR3, DQW2, BF*S, C4A*Q0 e C4B*1] em pacientes irlandeses.

Estudos com pacientes italianos caracterizaram aumento significativo na frequência do alelo BF*F1, em relação a população normal, e uma associação de BF*F1 com Dw3 e de BF*F com Dw7 (MALAVASI et al., 1980). Nenhum desses estudos realizou uma análise de associação entre o polimorfismo de BF e a gravidade da doença.

Inúmeros estudos em famílias têm buscado avaliar a contribuição dos genes da região do MHC (MEARIN et al., 1983; POLVI; MÄKI; PARTANEN, 1997; BEVAN et al., 1999; DE LA CONCHA et al., 2000) e não MHC (ZHONG et al., 1996; HOULSTON et al., 1997; GRECO et al., 1998a) para o risco familiar da DC.

Em relação ao polimorfismo de BF, apenas dois estudos de associação avaliam pacientes com DC e os respectivos familiares (ALPER et al., 1987; MANNION et al., 1993), sendo que, especificamente na população brasileira, ainda não se conhece nenhum estudo de associação entre polimorfismo do complemento e DC.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (anexo 1) e envolveu um total de 323 indivíduos do sul do Brasil, entre pacientes, familiares e grupo controle sadio, conforme detalhado no quadro 4 e nos itens a seguir.

QUADRO 4 - GRUPOS EM ESTUDO

GRUPOS	NÚMERO
PACIENTES	76
Recém-diagnosticados	33
Em dieta isenta de glúten	26
Em dieta contendo glúten	17
FAMILIARES	150
“Familiars EmA -”	127
“Familiars EmA +”	23
“Familiars EmA +” com DC confirmada	11
“Familiars EmA +” sem DC confirmada	12
CONTROLES	97

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Pacientes

Foram estudadas amostras de soros de 76 pacientes portadores de DC, não relacionados e selecionados aleatoriamente. Todos foram diagnosticados de acordo com critérios clínicos, histológicos e sorológicos.

Dentre os 76 pacientes, 56 (73,7%) eram do sexo feminino e 20 (26,3%) do sexo masculino, com a faixa etária entre 2 a 77 anos e média de 34,8 anos. A classificação

racial dos pacientes foi feita de acordo com a cor da pele, traços fisionômicos e ascendência, sendo caracterizado que 100% eram brancos.

Os pacientes foram subdivididos em 3 grupos: recém-diagnosticados (N=33), aderentes à dieta isenta de glúten (N=26) e não aderentes à dieta isenta de glúten (N=17) (tabela 1). O controle do uso de glúten foi realizado através da entrevista clínica, com questões relativas à transgressão das recomendações dietéticas, sendo que os pacientes com ingestão superior a 10mg de gliadina por dia foram considerados "não aderentes". Todos os pacientes aderentes à dieta isenta de glúten encontravam-se com mais de um ano de tratamento.

Foi verificado o nível sérico total de IgA em todos os pacientes, com o objetivo de evitar resultados falso-negativos na determinação do EmA-IgA devido à deficiência de IgA. Foi considerada como deficiência dessa imunoglobulina os níveis inferiores a 5 mg% (RITTMEYER; RHOADS, 1996; CATALDO et al., 1997).

As informações dos pacientes relativas ao nome, idade, sexo, classificação quanto ao uso de glúten, tipagem eletroforética de BF, anticorpos antiendomísio, grau de lesão da mucosa intestinal e presença de auto-anticorpos, encontram-se no apêndice 1.

TABELA 1 - DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES CELÍACOS, FAMILIARES E CONTROLES INCLUÍDOS NO ESTUDO

Grupos de estudo	Número	Sexo	Idade média (faixa)	Mediana
PACIENTES	76	56 F; 20 M	34,86 (2-77)	34
Recém-diagnosticados	33	25 F; 8 M	40,03 (3-66)	43
Em dieta isenta de glúten	26	18 F; 8 M	33,34 (2-77)	30
Em dieta contendo glúten	17	13 F; 4 M	27,47 (9-56)	30
FAMILIARES	150	87 F; 63 M	31,82 (2-75)	32,5
CONTROLES	97	67 F; 30 M	26,51 (1-71)	24

NOTA: F=feminino; M= masculino

4.1.2 Familiares

Foram estudados 150 familiares de 47 do total de 76 pacientes com DC, com uma proporção de 3,2 indivíduos por família. Todos se encontravam sob dieta alimentar normal, com exceção de três indivíduos já diagnosticados com DC e sob dieta isenta de glúten. Oitenta e sete indivíduos (58%) eram do sexo feminino e 63 (42%) masculino, com idade variando de 2 a 75 anos e média de 31,82 anos (tabela 1). Esse grupo foi utilizado, juntamente com os controles da população sadia, nas comparações com os pacientes. Os familiares em estudo eram predominantemente de primeiro grau.

Dentre os 150 familiares de celíacos, 23 (15,3%) apresentaram alterações clínicas, sorológicas e/ou histológicas que os diferenciaram dos demais familiares, caracterizando um grupo que passou a ser denominado de familiares EmA positivos ("familiares EmA+"), enquanto os demais (N=127) constituíram os familiares EmA negativos ("familiares EmA-"). No grupo de "familiares EmA+" (N=23) foi possível confirmar o diagnóstico de DC em 11 indivíduos que realizaram biópsia intestinal. Os demais familiares (N=12), por se recusarem a realizar o exame, não puderam ter o diagnóstico de DC confirmado, embora apresentassem o anticorpo antiendomísio positivo e demonstrassem melhora clínica com a retirada do glúten da alimentação.

Dentre os 11 familiares que se submeteram à biópsia, oito foram realizadas na mesma ocasião da coleta de sangue. Esses oito familiares, com os 37 pacientes que também foram biopsiados simultaneamente à coleta de sangue, constituíram o grupo de 45 indivíduos com os quais se fez a correlação entre os anticorpos EmA-IgA e as biópsias intestinais (gráfico 9).

Em alguns itens dos resultados, foram realizadas avaliações onde se reuniram os dados dos familiares (N=150) com os dos respectivos pacientes (N=47), denominando-se então este grupo de "famílias completas" (N=197).

Os dados dos "familiares EmA+", como nome, idade, sexo, tipagem eletroforética de BF, anticorpo antiendomísio, grau de lesão da mucosa intestinal e presença de auto-anticorpos, podem ser verificados no apêndice 3.

4.1.3 Grupo Controle

Como controles foram estudados 97 indivíduos voluntários e sadios, da mesma área geográfica dos pacientes, que apresentavam maior proximidade possível em relação ao sexo, idade, e origem étnica da amostragem dos pacientes. Esse grupo foi selecionado principalmente entre os profissionais da área da saúde do Hospital de Clínicas da UFPR e de alguns laboratórios particulares da cidade, entre outros voluntários.

A idade dos controles variou de 1 a 71 anos, com média de 26,5 anos, sendo 67 (69%) indivíduos do sexo feminino e 30 (31%) do masculino.

As informações do grupo controle como nome, idade, sexo, tipagem eletroforética de BF, anticorpos antiendomísio e presença de auto-anticorpos, estão demonstradas no apêndice 2.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Coleta de Sangue

Foi coletada uma amostra de 10 ml de sangue venoso, sem anticoagulante, de todos os pacientes, familiares e controles. Após centrifugação a 4°C (Centrífuga refrigerada Heraeus, Germany), as amostras de soros foram aliquotadas e armazenadas à temperatura de -80°C (Freezer GFL, Germany), até serem utilizadas nas determinações laboratoriais. A coleta de sangue e todas as determinações laboratoriais descritas a seguir ocorreram no Laboratório de Imunopatologia do Hospital de Clínicas, com prévio esclarecimento e consentimento dos indivíduos incluídos nos grupos em estudo.

4.2.2 Tipagem do Fator B

As variantes alotípicas de BF foram detectadas através de eletroforese em gel de agarose, sob alta voltagem, seguida de imunofixação com anticorpo anti-BF humano, de acordo com ALPER et al. (1972).

As amostras de soros foram aplicadas em placas de vidro contendo gel com 0,8% de agarose (Seakem ME, Marine Colloids, USA), em tampão barbital pH 8.7 (0,0008M de lactato de cálcio; 0,023M de barbital sódico; 0,0037M de ácido barbitúrico), e foram submetidas à eletroforese de alta voltagem (400V, 100mA, 40W), durante duas horas e trinta minutos, sob refrigeração constante a 8°C.

Para o preparo das placas (25 cm x 11 cm), aplicou-se 50 ml de agarose 0,8% (quente) sobre a placa pré-aquecida, fixando de imediato o pente de perfuração. Após 10 minutos, à temperatura ambiente, a placa era colocada na geladeira, por 30 minutos, para completa polimerização do gel. A seguir, o pente era retirado e eram aplicados 3µl de soro teste, de cada indivíduo, nos orifícios do gel. Em cada placa também era aplicado, nas extremidades, uma amostra de soro fresco para controle.

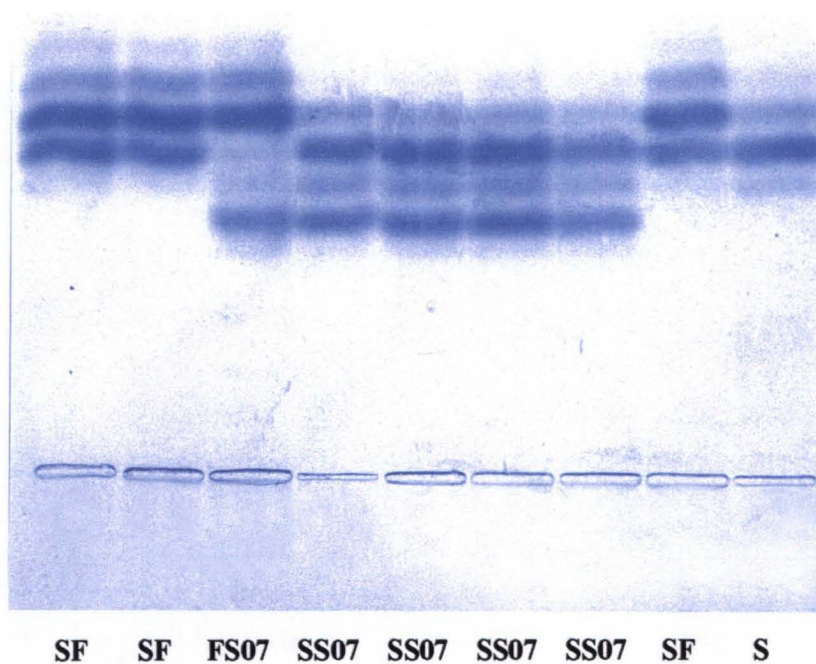
Simultaneamente, preparou-se o aparelho para a eletroforese (LKB-Pharmacia, Sweden), completando-se as duas cubas laterais com a solução de tampão barbital pH 8.7. A placa de vidro foi adaptada entre as cubas e colocou-se papel de filtro Whatmann nº 3 (duplo) como ponte entre o gel e o tampão.

Após a eletroforese, aplicou-se sobre o gel o anticorpo anti-BF (Atlantic Antibodies, USA) diluído 1:2 (200 µl de anti-BF e 200 µl de solução salina 0,9%), com o auxílio de um bastão de vidro. Procedeu-se a imunofixação com o anticorpo durante 90 minutos, à temperatura ambiente, e em câmara úmida. Em seguida, a placa foi lavada com solução salina 0,9% durante 18 horas, e então pressionada com 2 quilos de peso, sob várias folhas de papel filtro úmido, por 5 minutos. Após secar em estufa a 37°C, a placa foi corada com solução corante a 0,5% (Comassie Brilliant Blue R-250, Sigma, USA), durante 20 minutos, e a seguir descorada com solução descorante (450 ml de etanol a

96%; 100 ml de ácido acético glacial e 450 ml de H₂O destilada) por, aproximadamente, 10 minutos. Após lavar novamente a placa em água corrente e secar em estufa, procedeu-se a leitura das variantes de BF.

A leitura foi realizada pela visualização das bandas na região superior à aplicação dos soros na placa, comparando a localização das mesmas com a de soros padrões, de fenótipos conhecidos, conforme descrito na literatura (figura 7) (GESERICK, 1990).

FIGURA 7 – VARIANTES ALOTÍPICAS DE BF DETECTADAS ATRAVÉS DE ELETROFORESE DE ALTA VOLTAGEM



4.2.3 Pesquisa de Anticorpos Antiendomísio (EmA-IgA)

Os anticorpos antiendomísio foram investigados em todas as amostras de soros dos grupos em estudo, por técnica de imunofluorescência indireta (IFI), utilizando como

substrato cortes criostáticos de cordão umbilical humano, conforme descrito por LADINSER, ROSSIPAL e PITTSCHIELLER (1994).

4.2.3.1 Preparo do substrato

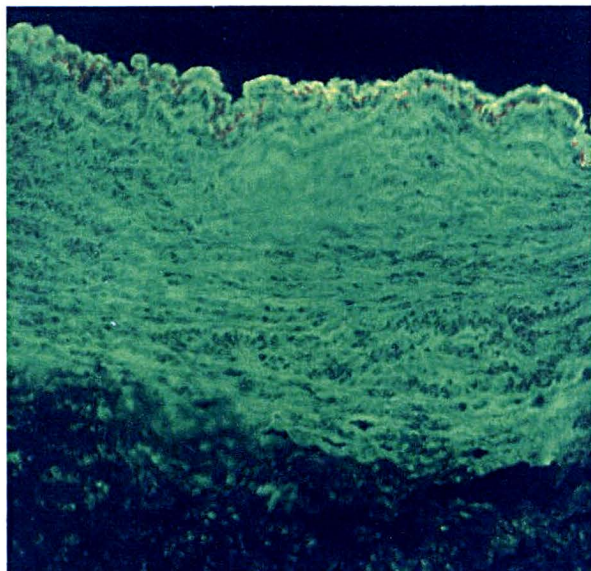
O cordão umbilical foi obtido de gestantes saudáveis, no momento do parto, atendidas no Centro Obstétrico do Hospital de Clínicas da UFPR. Após a excisão do cordão, um pequeno fragmento deste foi mergulhado em solução salina 0,9% e transportado ao Laboratório de Imunopatologia, onde foi seccionado, transversalmente, em pequenos blocos. Esses eram mergulhados em OCT-Tissue Tek (Miles, USA) e, rapidamente, congelados em nitrogênio líquido, sendo então mantidos à temperatura de -80°C. Foram realizados cortes criostáticos de 3µm de espessura (International Equipment Company, USA), colocados sob lâminas de vidro e mantidos em freezer à -20°C até o momento de uso nas reações de IFI.

4.2.3.2 Reação de IFI para pesquisa do EmA-IgA

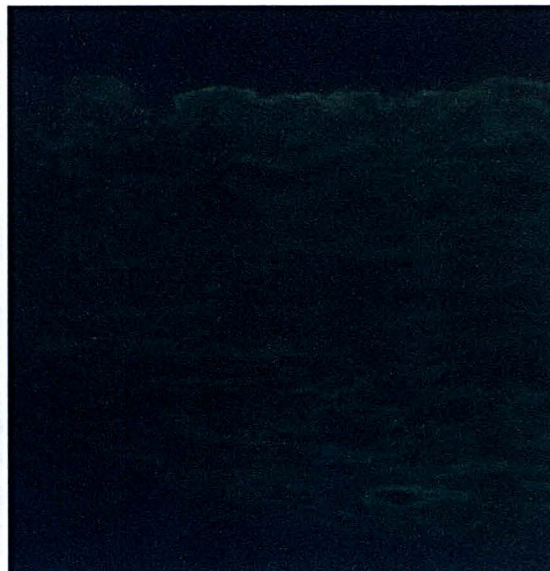
Os cortes criostáticos de cordão umbilical humano foram fixados em acetona gelada (10 minutos) e clorofórmio (30 minutos), previamente ao processamento da reação. As amostras de soro em estudo foram submetidas a diluições iniciais de triagem (1/2.5, 1/5 e 1/10), em tampão fosfato salina (PBS), pH 7.2, e aplicadas nas lâminas contendo o substrato. Após incubação em câmara úmida (30 minutos, temperatura ambiente) e lavagem das lâminas com PBS (3 vezes, 5 minutos cada vez), os cortes foram cobertos com o conjugado fluorescente anti-IgA humano F(ab')₂ (Kallestad, France), previamente titulado. Procedeu-se nova incubação e lavagem das lâminas, como já descrito, e montagem com glicerina alcalina.

As leituras foram realizadas em microscópio de fluorescência Carl Zeiss (Germany), sendo consideradas positivas as amostras que caracterizaram fluorescência, a partir da diluição 1/2.5, no tecido de endomísio (substância intermiofibrilar) que contorna as fibras de músculo liso na parede dos vasos e artérias do cordão umbilical (figura 8).

FIGURA 8 - ANTICORPO ANTIENDOMÍSIO DETECTADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA



NOTA: Reação positiva



Reação negativa

Todos os soros positivos nas diluições iniciais de triagem foram retestados para definição do título final de anticorpos antiendomísio.

Controles positivos e negativos foram incluídos em cada bateria de testes.

4.2.4 Pesquisa de Outros Auto-Anticorpos

Todas as amostras de soros foram investigadas, por técnica de IFI, para a presença dos auto-anticorpos antimúsculo liso (AML), antimitocôndria (AMA), antimicrosoma de fígado e rim (LKM), antinuclear (ANA), anticélula gástrica parietal (CGP) e anti microssomal tireoideano (AAM), conforme metodologia previamente descrita (RIZZETO; SWANA; DONIACH, 1973; BIGAZZI; ROSE, 1984).

4.2.4.1 Preparo do substrato

Os substratos utilizados na pesquisa desses auto-anticorpos compreendiam tecido de rato e tecido humano, como caracteriza o quadro 5.

QUADRO 5 - SUBSTRATOS DAS REAÇÕES DE IFI PARA PESQUISA DE AUTO-ANTICORPOS

AUTO-ANTICORPOS	SUBSTRATOS
Antimúsculo liso (AML)	Estômago de rato
Antimitocôndria (AMA)	Rim de rato
Antimicrosoma de fígado e rim (LKM)	Fígado e rim de rato
Antinuclear (ANA)	Fígado de rato
Anticélula gástrica parietal (CGP)	Estômago de rato
Antimicrosomal tireoideano (AAM)	Tireóide humana

Os ratos para obtenção do substrato eram provenientes do biotério da Universidade Federal do Paraná e eram mantidos em jejum por dois dias, antes de serem sacrificados.

Após o sacrifício do rato, por traumatismo craniano, procedeu-se a dissecação dos órgãos do animal e a lavagem exaustiva dos mesmos em soro fisiológico. Os órgãos foram então clivados em pequenos fragmentos, imersos em OCT-Tissue Tek (Miles, USA), e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Esses blocos foram mantidos em freezer a -80°C até serem realizados os cortes criostáticos de 3 µm de espessura. As lâminas contendo os cortes foram conservadas em freezer a -20°C até o momento de uso nas reações de IFI.

Procedimento semelhante de congelamento e preservação foi realizado com pequenos fragmentos de tireóide humana, provenientes de material de necropsia do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR.

4.2.4.2 Reação de IFI para pesquisa de auto-anticorpos

Todas as amostras de soros dos grupos em estudo foram diluídas a 1/10, 1/20 e 1/40 em tampão fosfato salina (PBS), pH 7.2, e submetidas a uma triagem inicial para pesquisa dos anticorpos AML, AMA, LKM, ANA, CGP e AAM. Os soros testes diluídos, assim como os soros controles positivos e negativos, foram aplicados nas lâminas contendo os cortes criostáticos dos substratos específicos para cada auto-anticorpo e incubados em câmara úmida durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagem das lâminas com PBS (3 vezes, 5 minutos cada vez), os tecidos foram incubados com conjugado fluorescente anti imunoglobulina humana (Sanofi-Pasteur, France), por 30 minutos, lavados novamente e a lâmina foi montada com glicerina alcalina.

As leituras foram realizadas em microscópio de fluorescência Carl-Zeiss, considerando-se positivas as reações fluorescentes com títulos iguais ou superiores a 1/40 para os anticorpos AML; iguais ou superiores a 1/10 para os anticorpos AAM e iguais ou superiores a 1/20 para os demais auto-anticorpos. Todos os soros positivos nas diluições iniciais de triagem também foram retestados para a definição do título final de cada anticorpo.

Os soros que deram reação positiva para o anticorpo antinuclear (ANA) também foram testados para o anticorpo anti-dsDNA, por reação de IFI, utilizando *Crithidia lucilliae* como substrato, conforme descrito por AARDEN et al. (1975). Também os soros positivos para o anticorpo antimicrosomal tireiodeano (AAM) tiveram tal reação confirmada pelo método Imunorradiométrico (IRMA), para pesquisa específica do anticorpo antiperoxidase (Kit Biodata, Italy).

4.2.5 Avaliação Histológica

Os dados relativos às biópsias intestinais foram obtidos de 71 dos 76 pacientes celíacos, sendo que 37 (52,1%) realizaram a biópsia por ocasião da coleta de sangue para

pesquisa dos anticorpos antiendomísio e dos outros auto-anticorpos. Nos demais pacientes (N=34; 47,8%), os achados foram através da análise criteriosa de seus prontuários, utilizando sempre as informações da primeira biópsia, realizada por ocasião do diagnóstico. Os fragmentos foram coletados utilizando-se cápsulas de Crosby-Kugler (College Park Instruments, MD, USA) ou com pinças usadas em endoscópios (Olympus, Japan) (KOTZE; PISANI, 1992). A avaliação histopatológica foi realizada por patologista, alheio aos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes. Foram seguidos os critérios descritos por BARBIERI et al. (1970), de uso corrente no Brasil, classificando os padrões morfológicos da mucosa jejunal desde normal (padrão I ou grau I) até atrofia total das vilosidades (padrão IV ou grau IV).

A contagem de linfócitos intra-epiteliais (LIE) foi realizada de acordo com FERGUSON e MURRAY (1971).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências fenotípicas de BF foram calculadas através de contagem direta. O número de indivíduos portadores dos alelos, detectados em cada grupo em estudo, também foi obtido por contagem direta, a partir das frequências fenotípicas, e convencionou-se denominar tal agrupamento como “distribuição dos alelos”. As frequências gênicas foram calculadas contando-se quantas vezes um determinado alelo esteve presente em uma determinada amostra e então se dividindo este número pelo número total de alelos existentes nesta mesma amostra.

A análise estatística do estudo foi realizada com o auxílio do *software* STATISTICA. A análise das frequências alotípicas nos grupos comparados foi feita através de uma tabela de contingências 2 x 2, aplicando-se sempre o teste Exato de Fisher. Os valores de *p* encontrados e que apresentavam significância estatística, foram multiplicados pelo número de alelos testados em um mesmo *locus*, obtendo-se desta forma o valor de *p corrigido* ou *pc* (GRUMET et al., 1971). Convencionou-se, no

presente estudo, multiplicar por três, considerando-se a existência de dois alelos principais de BF (BF*S e BF*F) e contando-se o total de alelos raros como um.

O nível de significância adotado foi menor que 0,05 ($p < 0,05$). O risco relativo (RR) foi calculado apenas nos casos em que se obteve associações estatisticamente significantes, utilizando-se a fórmula abaixo, de acordo com RYDER e SVEJGAARD (1981):

$$RR = \frac{\text{pacientes com o marcador} \times \text{controles sem o marcador}}{\text{pacientes sem o marcador} \times \text{controles com o marcador}}$$

O Coeficiente de Correlação de Pearson foi utilizado para se determinar a significância de correlação entre variáveis (EmA-IgA e biópsias) e para se conhecer a magnitude dessa relação.

5 RESULTADOS

A distribuição dos fenótipos de BF observada nos pacientes com DC encontra-se relacionada no apêndice 1, assim como os resultados dos anticorpos antiendomísio, dos demais auto-anticorpos e das biópsias intestinais. Os dados referentes aos controles estão demonstrados no apêndice 2, enquanto no apêndice 3 encontram-se os do grupo de "familiares EmA+".

5.1 DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALELOS DE BF EM PACIENTES CELÍACOS, FAMILIARES E CONTROLES. COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS

A distribuição das frequências fenotípicas de BF observadas nos pacientes, familiares e controles está demonstrada na tabela 2. A distribuição dos alelos e frequências gênicas de BF nos pacientes e controles normais encontra-se na tabela 3. O alelo raro *F1 foi observado em 6 (7,9%) pacientes e em 5 (5,15%) indivíduos do grupo controle e o alelo raro *S07 em 5 (6,6%) pacientes e em 5 (5,15%) indivíduos do grupo controle (frequência gênica $< 0,1$).

A comparação da distribuição dos fenótipos e alelos de BF entre os pacientes com DC (n=76) e os controles (n=97) não demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os mesmos (tabelas 2 e 3). Estes dados encontram-se ilustrados no gráfico 1.

De 47 pacientes com DC, pertencentes ao grupo total dos 76 pacientes em estudo, foi possível analisar a distribuição dos fenótipos de BF em 150 de seus familiares. A distribuição dos alelos e frequências gênicas de BF nesses familiares (n=150) e nos respectivos pacientes (n=47) encontram-se na tabela 4. Nos familiares observou-se maior frequência gênica de BF*S (0,850) quando comparados com os pacientes (0,777) e menor frequência gênica de BF*F (0,107 e 0,149 respectivamente). O alelo raro *F1 foi observado em 9/150 (6%) familiares e em 5/47 (10,6%) pacientes e o alelo raro *S07 em

4/150 (2,66%) familiares e 2/47 (4,25%) pacientes. A distribuição desses alelos, porém, não demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos.

TABELA 2 - FREQUÊNCIA FENOTÍPICA DE BF EM PACIENTES CELÍACOS, FAMILIARES E CONTROLES. COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ENTRE OS GRUPOS

FENÓTIPOS DE BF	PACIENTES N (%)	FAMILIARES N (%)	CONTROLES N (%)	p*
SF	20 (26,3)	27 (18,0)	34 (35,0)	0,002 ⁽¹⁾
S	42 (55,3)	108 (72,0)	51 (52,6)	0,001 ⁽²⁾
F	4 (5,3)	2 (1,3)	2 (2,06)	ns
SS07	4 (5,3)	4 (2,66)	3 (3,1)	ns
SF1	5 (6,5)	8 (5,3)	3 (3,1)	ns
FF1	0 (0)	1 (0,66)	2 (2,06)	ns
FS07	0 (0)	0 (0)	2 (2,06)	ns
F1S07	1 (1,3)	0 (0)	0 (0)	ns
TOTAL	76 (100)	150 (100)	97 (100)	

NOTAS: Comparação entre pacientes x controles= não significativo para todos os fenótipos

p*= comparação entre familiares x controles

⁽¹⁾ p=0,002; pc= 0,006

⁽²⁾ p=0,001; pc= 0,003

Teste exato de Fisher

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS E FREQUÊNCIAS GÊNICAS DE BF EM PACIENTES CELÍACOS E CONTROLES. COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS ENTRE OS GRUPOS

ALELOS DE BF	PACIENTES		CONTROLES		p (FISHER)
	N (%)	Freq. Gênica	N (%)	Freq. Gênica	
S	71 (93,4)	0,743	91 (93,8)	0,732	ns
F	24 (31,6)	0,184	40 (41,2)	0,216	ns
F1	6 (7,9)	0,039	5 (5,15)	0,026	ns
S07	5 (6,6)	0,033	5 (5,15)	0,026	ns
TOTAL	Em 76	1	Em 97	1	
	pacientes		controles		

NOTAS: N= número de indivíduos em que o alelo está presente

Freq. Gênica= Frequência Gênica

ns= não significativa a nível de 0,05

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS E FREQUÊNCIAS GÊNICAS DE BF EM FAMILIARES DE CELÍACOS E RESPECTIVOS PACIENTES

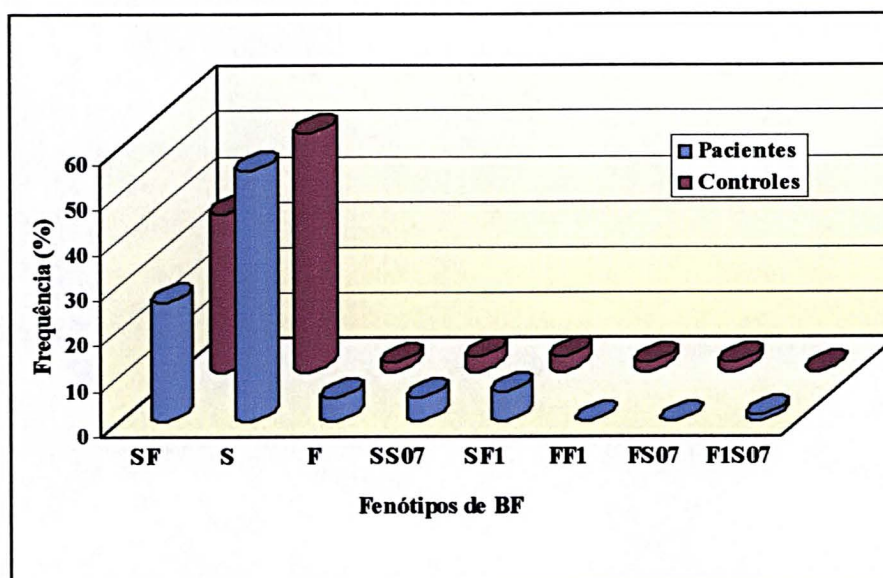
ALELOS DE BF	FAMILIARES		PACIENTES		p (FISHER)
	N (%)	Freq. Gênica	N (%)	Freq. Gênica	
S	147 (98,0)	0,850	47 (100,0)	0,777	ns
F	30 (20,0)	0,107	14 (29,8)	0,149	ns
F1	9 (6,0)	0,030	5 (10,6)	0,053	ns
S07	4 (2,66)	0,013	2 (4,25)	0,021	ns
TOTAL	Em 150 familiares	1	Em 47 pacientes	1	

NOTAS: N= número de indivíduos em que o alelo está presente

Freq. Gênica= Frequência Gênica

ns= não significante a nível de 0,05

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM DOENÇA CELÍACA E CONTROLES



NOTA: Pacientes x controles= ns para todos os fenótipos

5.1.1 Familiares X Controles

Como se pode observar na tabela 2 e no gráfico 2, a análise comparativa da distribuição dos fenótipos de BF entre os familiares de celíacos e os controles normais caracterizou tanto um aumento estatístico significativo de BF S nos familiares (72%, 108/150 nos familiares x 52,6%, 51/97 nos controles; $p=0,001$; $pc=0,003$; $RR=2,32$), como diminuição de BF SF nos mesmos (18%, 27/150 nos familiares x 35%, 34/97 nos controles; $p=0,002$; $pc=0,006$). Quando se comparou a distribuição dos alelos entre esses 2 grupos (tabela 5), a diminuição do alelo BF*F evidenciou ainda maior significância (20%, 30/150 nos familiares x 41,2%, 40/97 nos controles; $p=0,0003$; $pc=0,0009$), enquanto o aumento de BF*S atingiu níveis próximos da significância (98%, 147/150 nos familiares x 93,8%, 91/97 nos controles; $p=0,087$), com RR de 3,23.

A comparação da distribuição dos fenótipos e alelos de BF entre os "familiares EmA-" ($n=127$) e os controles manteve diferenças tão significativas quanto as que foram descritas para os familiares totais ($n=150$) em relação ao aumento do fenótipo BF S e alelo BF*S e à diminuição do fenótipo BF SF e alelo BF*F nos mesmos (gráfico 2 e apêndice 4).

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS DE BF ENTRE OS FAMILIARES DE CELÍACOS, FAMÍLIAS COMPLETAS E OS CONTROLES

ALELO BF	Controles N (%)	Familiares N (%)	Famílias completas N (%)	p (Fisher)	
				Fam. x Contr.	Fam.compl. x Contr.
S	91(93,8)	147 (98,0)	194 (98,5)	0,087 ⁽¹⁾	0,038 ⁽³⁾
F	40 (41,2)	30 (20,0)	44 (22,3)	0,0003 ⁽²⁾	0,0007 ⁽⁴⁾
F1	5 (5,15)	9 (6,0)	14 (7,1)	ns	ns
S07	5 (5,15)	4 (2,66)	6 (3,04)	ns	ns
TOTAL	Em 97 controles	Em 150 familiares	Em 197 indivíduos		

NOTAS: N= número de indivíduos em que o alelo está presente

ns= não significativa a nível de 0,05

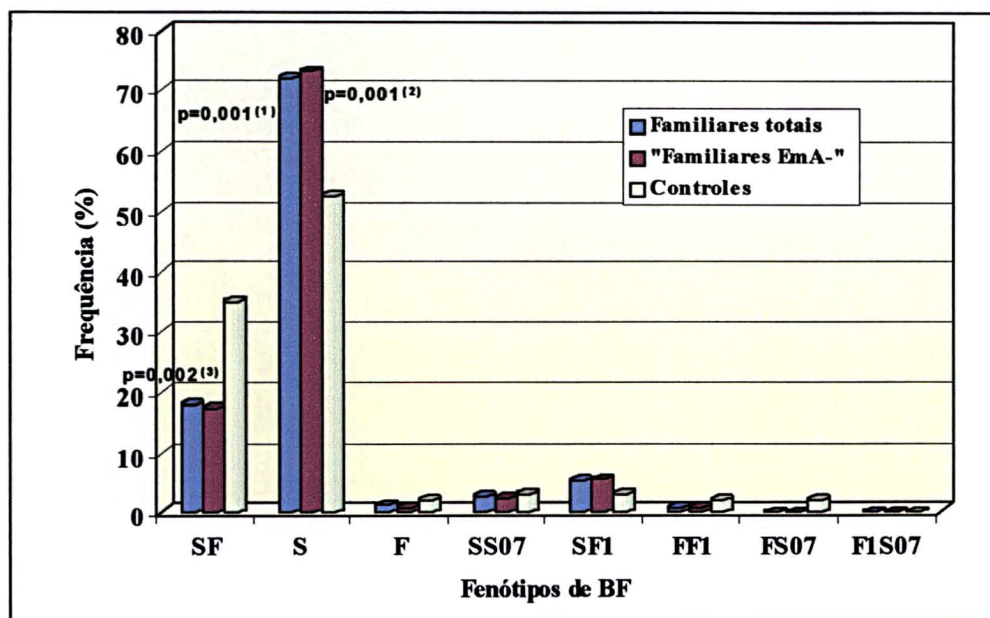
⁽¹⁾ $p=0,087$; $RR=3,23$

⁽²⁾ $p=0,0003$; $pc=0,0009$

⁽³⁾ $p=0,038$; $pc=0,114$; $RR=4,26$

⁽⁴⁾ $p=0,0007$; $pc=0,0021$

GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF ENTRE FAMILIARES DE CELÍACOS E CONTROLES



NOTAS: ⁽¹⁾ Familiares totais x controles: $p=0,001$; $pc=0,003$; $RR=2,32$

⁽²⁾ "Familiares EmA-" x controle: $p=0,001$; $pc=0,003$; $RR=2,46$

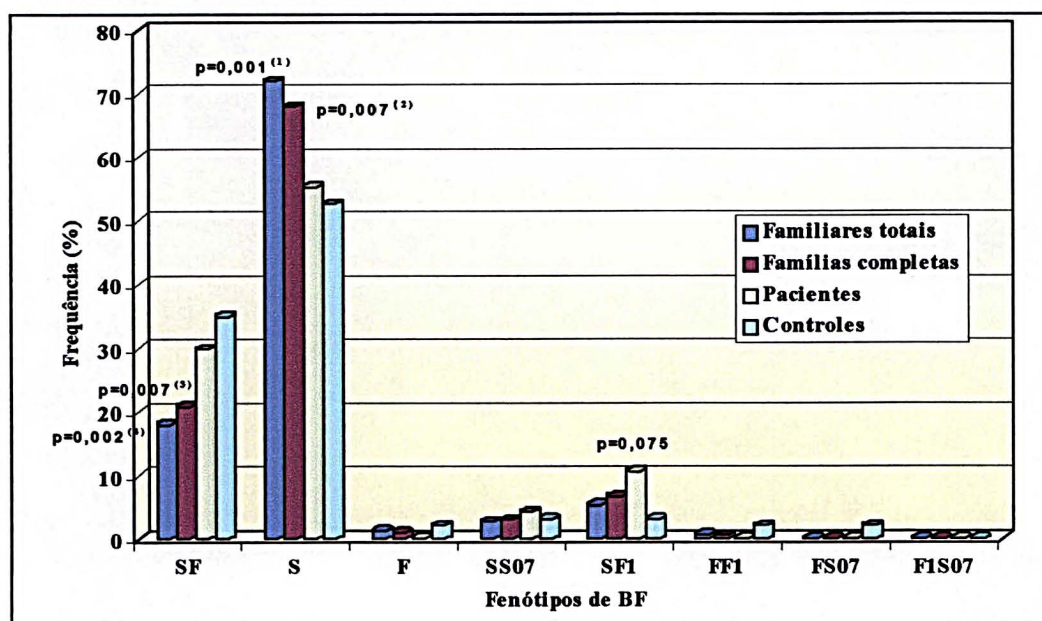
⁽³⁾ Familiares totais x controles: $p=0,002$; $pc=0,006$

5.1.2 Famílias Completas X Controles

A observação de diferenças significativas nos familiares de pacientes celíacos em relação aos controles levou à análise da distribuição dos fenótipos de BF na família completa (150 familiares + 47 pacientes). Essa evidenciou resultados similares àqueles observados apenas com os familiares quando comparados aos controles (gráfico 3), com aumento significativo de BF S ($p=0,007$; $pc=0,021$) e diminuição de BF SF ($p=0,007$; $pc=0,021$). A comparação da distribuição dos alelos de BF mostrou diminuição do alelo BF*F nas famílias completas (22,3%, 44/197 nas famílias x 41,2%, 40/97 nos controles; $p=0,0007$; $pc=0,0021$) e aumento do alelo BF*S nas mesmas (98,5%, 194/197 nas famílias x 93,8%, 91/97 nos controles; $p=0,038$). Quando corrigido esse valor de p deixou de ser significativo ($pc=0,114$), porém com RR de 4,26 (tabela 5).

Assim como se verificou para os 76 pacientes com DC, a distribuição dos fenótipos de BF nos 47 pacientes das famílias não apresentou diferença significativa em relação aos controles, como se pode observar no gráfico 3. Apenas para o fenótipo BF SF1 houve um aumento de frequência, porém sem atingir significância estatística (10,6%, 5/47 nos pacientes x 3,1%, 3/97 nos controles; $p=0,075$). A comparação da distribuição dos alelos de BF entre esses pacientes e os controles normais também não demonstrou nenhuma diferença significativa, apesar do alelo BF*F1 nos pacientes mostrar o dobro da porcentagem dos controles (10,6%, 5/47 nos pacientes x 5,15%, 5/97 nos controles; $p=0,191$). As frequências gênicas nesses pacientes pode ser observada na tabela 4 ou apêndice 5.

GRÁFICO 3 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM FAMÍLIAS DE PACIENTES CELÍACOS E CONTROLES



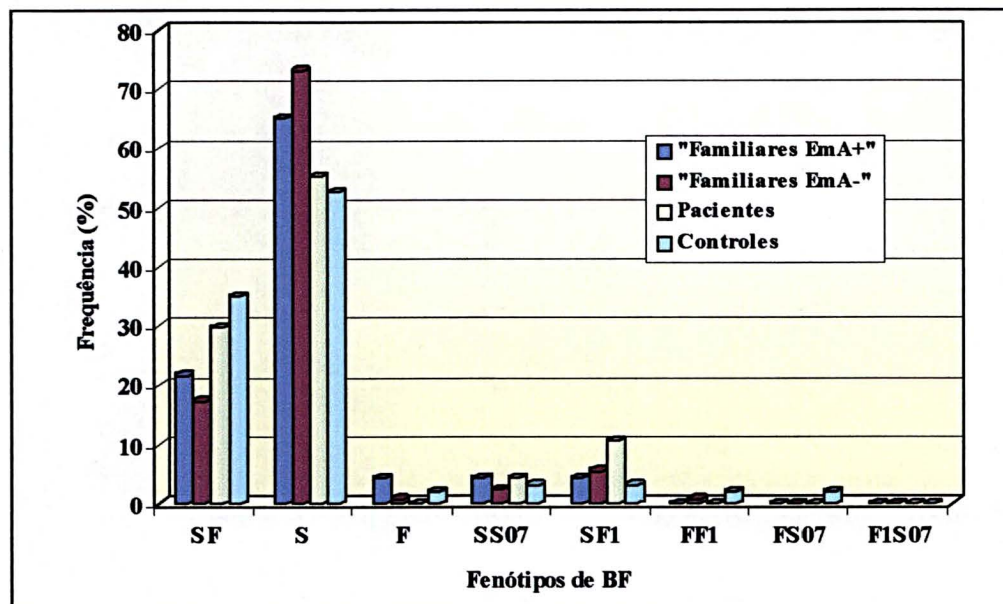
NOTAS: (1) Familiares totais x controles: $p=0,001$; $pc=0,003$; $RR=2,32$
 (2) Famílias completas x controles: $p=0,007$; $pc=0,021$; $RR=1,91$
 (3) Famílias completas x controles: $p=0,007$; $pc=0,021$
 (4) Familiares totais x controles: $p=0,002$; $pc=0,006$

5.1.3 "Familiares EmA+" X Pacientes e Controles

Os dados detalhados do grupo de "familiares EmA+", com os resultados dos anticorpos e da tipagem de BF encontram-se no apêndice 3 e as frequências gênicas no apêndice 5.

A distribuição dos fenótipos e alelos de BF nos "familiares EmA+" foi similar à observada nos pacientes, controles e "familiares EmA-", não evidenciando diferença significativa entre os grupos (gráfico 4; apêndice 4). Assim como os pacientes celíacos, o grupo de "familiares EmA+" não apresentou diferença significativa em relação aos indivíduos sadios da população. Além do que, os mesmos não diferem dos pacientes nem dos "familiares EmA-".

GRÁFICO 4 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF ENTRE "FAMILIARES EmA+", "FAMILIARES EmA-", PACIENTES E CONTROLES

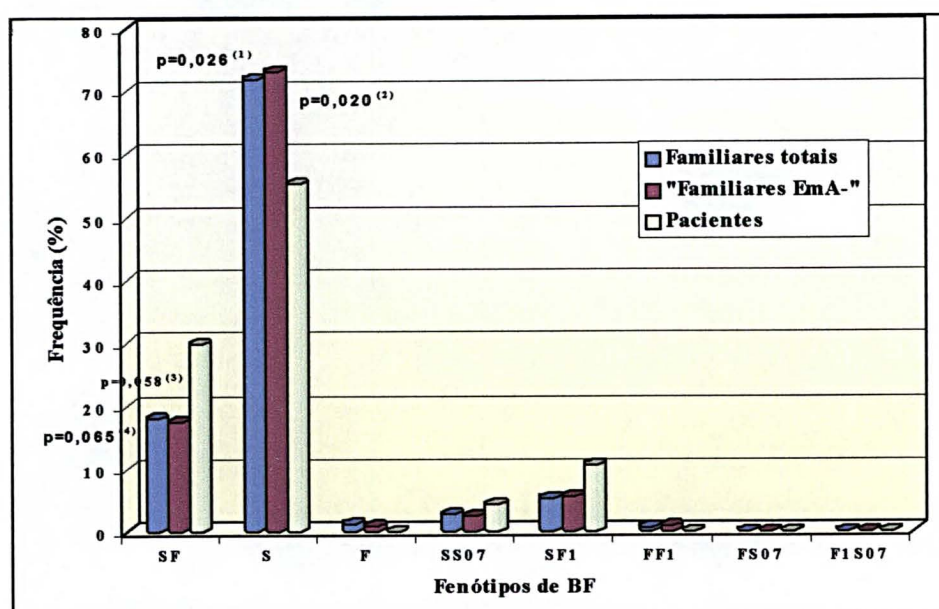


NOTA: p=ns para todas as comparações entre os grupos

5.1.4 Pacientes X Familiares

A comparação da distribuição dos fenótipos de BF entre os pacientes com DC (n=47) e os familiares totais (n=150) mostrou uma diminuição significativa na frequência de BF S nos pacientes (55,3%, 26/47 nos pacientes x 72,0%, 108/150 nos familiares; $p=0,026$; $pc=0,078$), além de aumento próximo da significância para BF SF (29,8%, 14/47 nos pacientes x 18,0%, 27/150 nos familiares; $p=0,065$; $pc=0,195$; $RR=1,93$) (gráfico 5). A distribuição dos alelos de BF entre esses dois grupos não foi significativamente diferente (tabela 4). A comparação dos pacientes celíacos (n=47) com os "familiares EmA-" (n=127) manteve diferenças similares aos resultados obtidos com os familiares totais (n=150) em relação ao aumento do fenótipo BF SF próximo à significância ($p=0,058$; $pc=0,174$; $RR=2,02$) e a diminuição significativa do fenótipo BF S ($p=0,020$; $pc=0,060$) nos pacientes (apêndice 4 e gráfico 5).

GRÁFICO 5 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF ENTRE PACIENTES CELÍACOS E FAMILIARES



NOTAS: (1) Pacientes x familiares totais: $p=0,026$; $pc=0,078$

(2) Pacientes x "familiares EmA-": $p=0,020$; $pc=0,060$

(3) Pacientes x "familiares EmA-": $p=0,058$; $pc=0,174$; $RR=2,02$

(4) Pacientes x familiares totais: $p=0,065$; $pc=0,195$; $RR=1,93$

5.2 DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALELOS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO EM RELAÇÃO AO SEXO

A análise da distribuição dos fenótipos de BF entre os indivíduos do sexo masculino e feminino nas amostras dos pacientes, familiares e controles não demonstrou diferença significativa entre os grupos estudados (tabela 6). Também não foi observada diferença entre os mesmos na análise dos alelos de BF.

A proporção de indivíduos do sexo feminino para masculino foi de 2,8:1 (56 mulheres; 20 homens) entre os pacientes. No grupo controle a proporção foi de 2,2:1.

Os resultados da comparação da distribuição dos fenótipos e alelos de BF entre todos os grupos em estudo, analisando-se sexo feminino x feminino e sexo masculino x masculino, podem ser observados no apêndice 6. Uma diferença significativa foi observada na frequência de BF S, entre pacientes e familiares do sexo feminino (72,4%, 63/87 nos familiares x 51,4%, 18/35 nos pacientes; $p=0,023$; $pc=0,069$). Uma diferença significativa foi também observada entre os familiares totais e controles do sexo feminino

TABELA 6 - ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO, EM RELAÇÃO AO SEXO DOS INDIVÍDUOS

FENÓTIPO BF	PACIENTES (N=76)		FAMILIARES (N=150)		CONTROLES (N=97)	
	F	M	F	M	F	M
SF	16	4 (ns)	17	10 (ns)	27	7 (ns)
S	30	12 (ns)	63	45 (ns)	34	17 (ns)
F	3	1 (ns)	1	1 (ns)	2	- (ns)
SS07	3	1 (ns)	2	2 (ns)	1	2 (ns)
SF1	4	1 (ns)	3	5 (ns)	2	1 (ns)
FF1	-	- -	1	- -	-	2 (ns)
FS07	-	- -	-	- -	1	1 (ns)
F1S07	-	1 (ns)	-	- -	-	- -
TOTAL	56	20	87	63	67	30

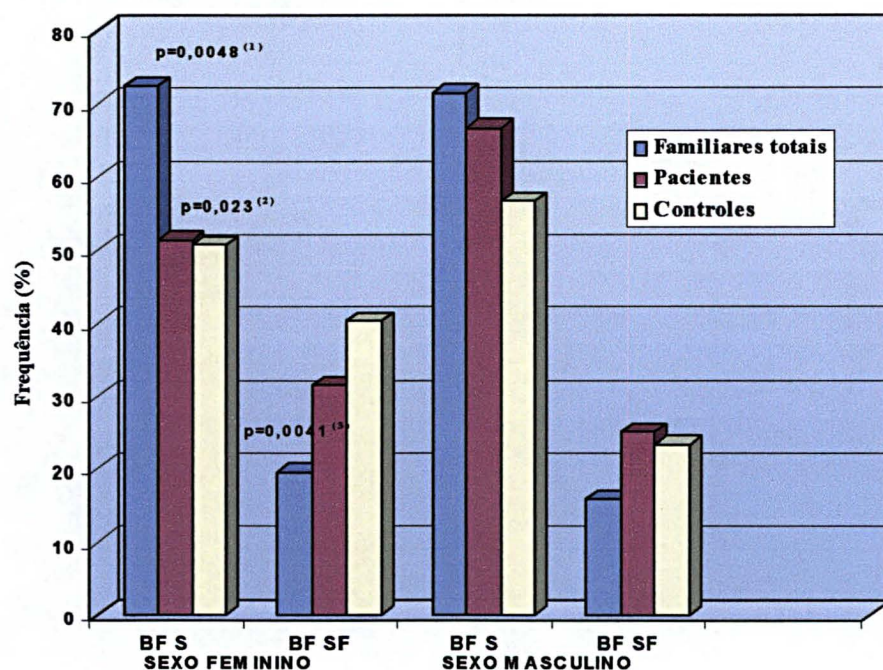
NOTAS: F=sexo feminino; M=sexo masculino

ns= não significativa a nível de 0,05. Teste exato de Fisher.

com aumento significativo do fenótipo BF S (72,4%, 63/87 nos familiares x 50,7%, 34/67 nos controles; $p=0,0048$; $pc=0,0144$; $RR=2,55$), e diminuição significativa de BF SF nos familiares do sexo feminino (19,5%, 17/87 nos familiares x 40,3%, 27/67 nos controles; $p=0,0041$; $pc=0,0123$) (gráfico 6 e apêndice 6). Também o alelo BF*F mostrou-se diminuído nos familiares femininos, quando comparados aos controles femininos (21,8%, 19/87 nos familiares x 44,7%, 30/67 nos controles; $p=0,0022$; $pc=0,0066$; tabela 7). A comparação da distribuição dos alelos entre pacientes e familiares do sexo feminino não se mostrou significativa.

Em relação ao sexo masculino, essas diferenças não atingiram valores estatisticamente significantes (gráfico 6 e tabela 7).

GRÁFICO 6 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS BF S E BF SF ENTRE FAMILIARES DE CELÍACOS, PACIENTES E CONTROLES, EM RELAÇÃO AO SEXO DOS INDIVÍDUOS



NOTAS: (1) Familiar x controle: $p=0,0048$; $pc=0,0144$; $RR=2,55$

(2) Familiar x paciente: $p=0,023$; $pc=0,069$; $RR=2,48$

(3) Familiar x controle: $p=0,0041$; $pc=0,0123$

A comparação das "famílias completas" e "familiares EmA-" com o grupo controle, tanto em relação aos fenótipos como aos alelos de BF, caracterizou resultados similares para o sexo feminino, como se observa no apêndice 6.

TABELA 7 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS DE BF ENTRE OS FAMILIARES DE CELÍACOS E OS CONTROLES, EM RELAÇÃO AO SEXO DOS INDIVÍDUOS

ALELO BF	FAMILIARES x CONTROLES				FAMILIARES x CONTROLES			
	F (N)	x	F (N)	p (Fisher)	M (N)	x	M (N)	p (Fisher)
S	85		64	ns	62		27	0,097
F	19		30	0,0022*	11		10	0,076
F1	4		2	ns	5		3	ns
S07	2		2	ns	2		3	ns
TOTAL	Em 87 F		Em 67 F		Em 63 M		Em 30 M	

NOTAS: F= sexo feminino; M= sexo masculino

N= número de indivíduos em que o alelo está presente

ns= não significante à nível de 0,05

*p=0,0022; pc= 0,0066

5.3 ANTICORPOS ANTIENDOMÍCIO (EmA-IgA) E FENÓTIPOS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO

5.3.1 Positividade dos Anticorpos Antiendomísio

Uma positividade de 100% foi observada para o EmA-IgA tanto no grupo de pacientes recém-diagnosticados (33/33) como naqueles pacientes em uso de glúten (17/17). Em contraste, uma ausência de positividade (0%) foi observada nos pacientes celíacos com dieta totalmente isenta de glúten (0/26). No total das amostras de pacientes celíacos (n=76), sem considerar o tratamento, a positividade do EmA-IgA foi de 65,8% (gráfico 7 e tabela 8).

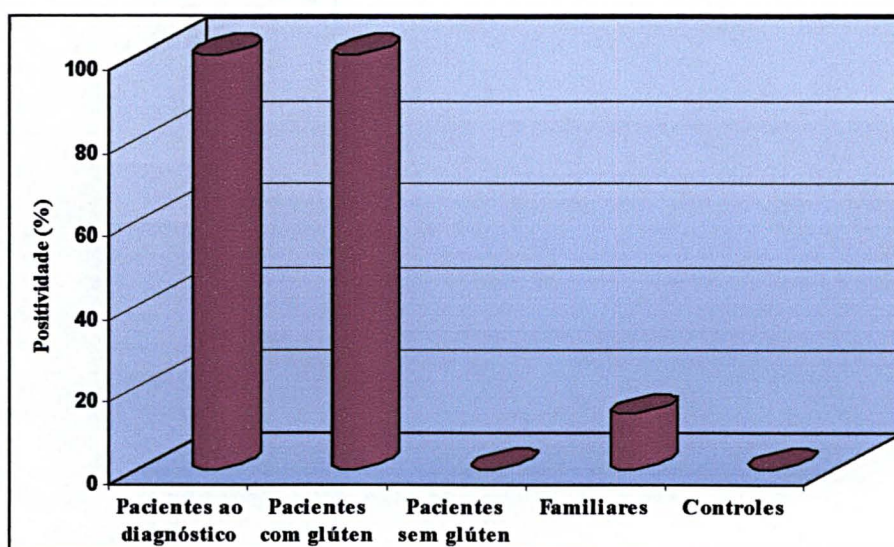
Em 150 familiares de celíacos, vinte foram positivos para a presença do EmA-IgA, caracterizando uma positividade de 13,3%. Três familiares, previamente diagnosticados, por já se encontrarem em dieta isenta de glúten, mostraram-se negativos para o EmA-IgA.

Nenhuma amostra do grupo controle foi positiva para o EmA-IgA (0/97; gráfico 7 e tabela 8).

TABELA 8 - POSITIVIDADE DOS ANTICORPOS ANTIENDOMÍSIO (EmA-IgA) NOS GRUPOS EM ESTUDO

Grupos (N)		EmA-IgA positivo N (%)	EmA-IgA negativo N (%)
PACIENTES CELÍACOS	(76)	50 (65,8)	26 (34,2)
Recém-diagnosticados	(33)	33 (100)	00
Em dieta contendo glúten	(17)	17 (100)	00
Em dieta isenta de glúten	(26)	00	26 (100)
FAMILIARES	(150)	20 (13,3)	130 (86,7)
CONTROLES	(97)	00	97 (100)

GRÁFICO 7 - POSITIVIDADE DOS ANTICORPOS ANTIENDOMÍSIO NOS GRUPOS EM ESTUDO

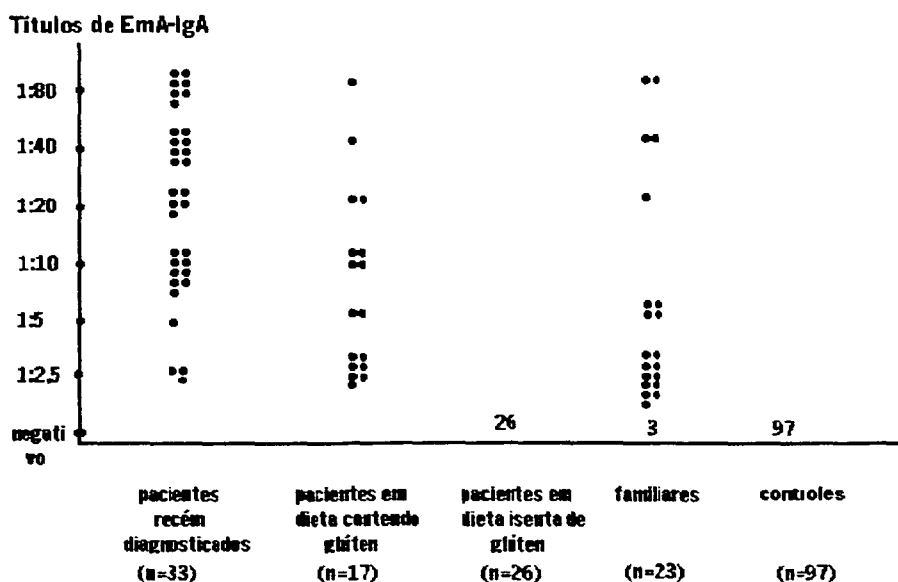


5.3.2 Títulos dos Anticorpos Antiendomísio

A positividade do EmA-IgA apresentou uma variação de títulos na faixa de 1:2,5 a 1:80, tanto nos pacientes recém-diagnosticados e naqueles em dieta contendo glúten, assim como no grupo de familiares que foram positivos para o EmA-IgA (n=20) (gráfico 8).

A análise da distribuição dos títulos do EmA-IgA permitiu observar que 26% dos pacientes (13/50) apresentaram títulos $\leq 1:5$ e 74% desses (37/50) tinham títulos $\geq 1:10$ (tabela 9). Os títulos $\geq 1:10$ de EmA-IgA foram correlacionados com as formas mais graves da DC, caracterizada por biópsias intestinais de grau III e grau IV (apêndice 1). Nas amostras em que a realização do EmA-IgA foi simultânea à biópsia intestinal, a concordância entre títulos altos ($\geq 1:10$) e biópsias grau III/IV foi de 96,2 %. Por outro lado, observou-se que 75% (15/20) dos familiares positivos para os anticorpos antiendomísio apresentavam títulos $\leq 1:5$ e 25% destes (5/20) tinham títulos $\geq 1:10$. A concordância dos baixos títulos ($\leq 1:5$) com a presença de biópsias grau II nesse grupo de familiares foi de 75%.

GRÁFICO 8 - TÍTULOS DE ANTICORPOS ANTIENDOMÍSIO NOS GRUPOS EM ESTUDO



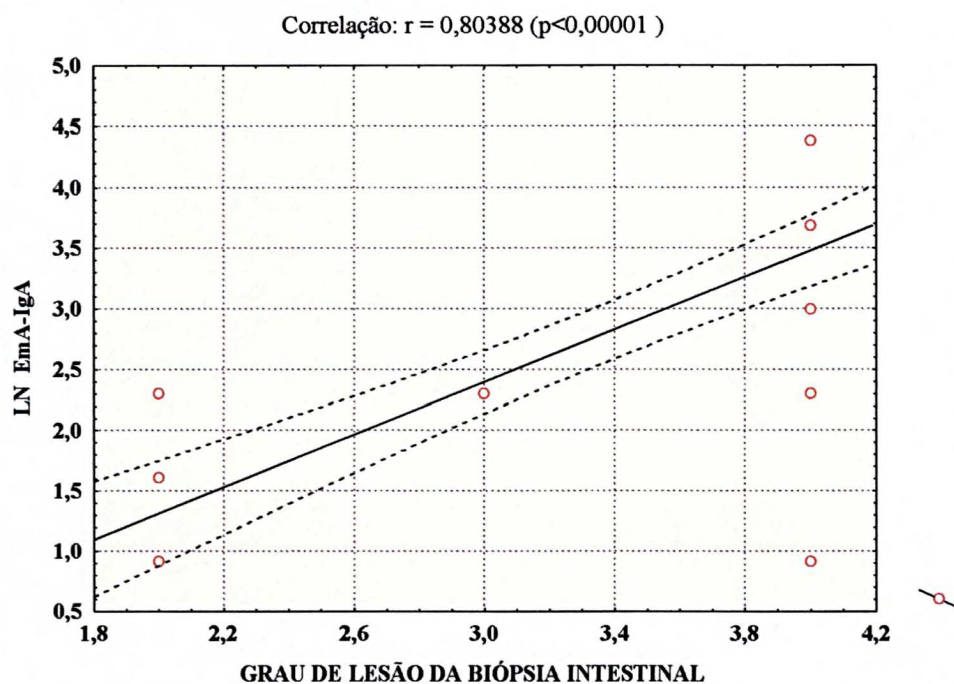
No gráfico 9 está demonstrada a correlação entre os títulos dos anticorpos EmA-IgA e o grau de lesão das biópsias intestinais ($r=0,80388$; $p<0,00001$), nos casos em que tais determinações foram realizadas na mesma ocasião.

TABELA 9 - POSITIVIDADE DE EmA-IgA EM PACIENTES COM DOENÇA CELÍACA E FAMILIARES, EM RELAÇÃO A TÍTULOS $\leq 1:5$ E $\geq 1:10$

AMOSTRAS	EmA-IgA	
	Título $\leq 1:5$ N(%)	Título $\geq 1:10$ N(%)
Pacientes (N=50)	13 (26)	37 (74)
Familiares (N=20)	15 (75)	5 (25)

NOTA: $p=0,0004$

GRÁFICO 9 - ANTICORPOS ANTIENDOMÍSIO X BIÓPSIA INTESTINAL NA DOENÇA CELÍACA



NOTA: LN= logaritmo natural

5.3.3 Análise da Distribuição dos Fenótipos e Alelos de BF nos Pacientes e Familiares de Celiacos, em Relação aos Títulos de EmA-IgA

A distribuição dos fenótipos de BF nos pacientes celiacos e familiares, em relação aos diferentes títulos de EmA-IgA (gráfico 10) não mostrou diferença significativa entre esses. Também não houve diferença significativa na distribuição dos fenótipos de BF ao realizar-se a análise em relação aos títulos de EmA-IgA, agrupando as amostras com títulos $\leq 1:5$ e $\geq 1:10$ (tabela 10).

GRÁFICO 10 - DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM PACIENTES CELÍACOS E FAMILIARES, EM RELAÇÃO AOS TÍTULOS DE ANTICORPOS ANTI-ENDOMÍLIO



TABELA 10 – FENÓTIPOS DE BF EM PACIENTES CELÍACOS E FAMILIARES EM RELAÇÃO A TÍTULOS DE EmA-IgA $\leq 1:5$ E $\geq 1:10$

PACIENTES*			FAMILIARES**		
FENÓTIPO BF	EmA-IgA $\leq 1:5$	EmA-IgA $\geq 1:10$	FENÓTIPO BF	EmA-IgA $\leq 1:5$	EmA-IgA $\geq 1:10$
SF (12)	2	10	SF (3)	2	1
S (30)	9	21	S (14)	10	4
F (4)	-	4	F (1)	1	-
SS07 (3)	1	2	SS07 (1)	1	-
SF1 (1)	1	-	SF1 (1)	1	-
TOTAL (50)	13	37	(20)	15	5

NOTA: * EmA-IgA $\leq 1:5$ vs EmA-IgA $\geq 1:10$: não significante para todos os fenótipos

** EmA-IgA $\leq 1:5$ vs EmA-IgA $\geq 1:10$: não significante para todos os fenótipos

Teste exato de Fisher

5.4 GRAU DE LESÃO DAS BIÓPSIAS INTESTINAIS E FENÓTIPOS DE BF EM PACIENTES CELÍACOS E FAMILIARES

5.4.1 Grau de Lesão das Biópsias Intestinais

Dos 76 pacientes celíacos em estudo, foi possível obter os dados das biópsias intestinais de 71 desses, sendo que 37 realizaram a biópsia simultânea à coleta do sangue para pesquisa do EmA-IgA. Nos demais pacientes, os dados das biópsias foram obtidos no prontuário dos pacientes, utilizando-se sempre os resultados da primeira biópsia, por ocasião do diagnóstico. A tabela 11 mostra que 8,45% (6/71) dos pacientes apresentaram biópsia com lesão de grau II e 91,5% (65/71) apresentaram biópsia com lesão de grau III ou IV.

Dentre os 23 "familiares EmA+" (15,3%; 23/150), 11 se submeteram à biópsia entérica, sendo que 54,5% (6/11) apresentaram lesão de grau II e 45,4% (5/11) tinham lesão de grau III/IV.

TABELA 11 - GRAU DE LESÃO DAS BIÓPSIAS INTESTINAIS EM PACIENTES CELÍACOS E "FAMILIARES EmA+"

AMOSTRAS	BIÓPSIAS	
	GRAU II N (%)	GRAU III/IV N (%)
Pacientes (N=71)	6 (8,45)	65 (91,5)
Familiares (N=11)	6 (54,5)	5 (45,4)

NOTA: p= 0,0009

5.4.2 Distribuição dos Fenótipos e Alelos de BF nos Pacientes Celíacos e Familiares, em Relação ao Grau de Lesão das Biópsias Intestinais

Tanto nos pacientes celíacos como nos familiares não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa na análise da distribuição dos fenótipos e alelos de BF, em relação ao grau de lesão das biópsias intestinais (tabelas 12 e 13).

O número limitado de "familiares EmA+" com biópsias grau II (n=6) e III/IV (n=5), não permitiu uma análise conclusiva dos dados demonstrados na tabela 13.

TABELA 12 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF ENTRE PACIENTES CELÍACOS COM BIÓPSIA GRAU II E GRAU III/IV

FENÓTIPO BF (N=71)	Biópsia grau II (n=6)	Biópsia grau III/IV (n=65)	p (Fisher)
SF (19)	2	17	ns
S (39)	4	35	ns
F (3)	-	3	ns
SS07 (4)	-	4	ns
SF1 (5)	-	5	ns
F1S07 (1)	-	1	ns
TOTAL (71)	6	65	

TABELA 13 - DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM FAMILIARES DE PACIENTES CELÍACOS COM BIÓPSIA GRAU II E GRAU III/IV

FENÓTIPO BF (N=11)	Biópsia grau II (n=6)	Biópsia grau III/IV (n=5)
SF (3)	1	2
S (6)	3	3
SS07 (1)	1	-
SF1 (1)	1	-
TOTAL (11)	6	5

5.5 DEMAIS AUTO-ANTICORPOS E FENÓTIPOS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO

5.5.1 Positividade dos Auto-Anticorpos

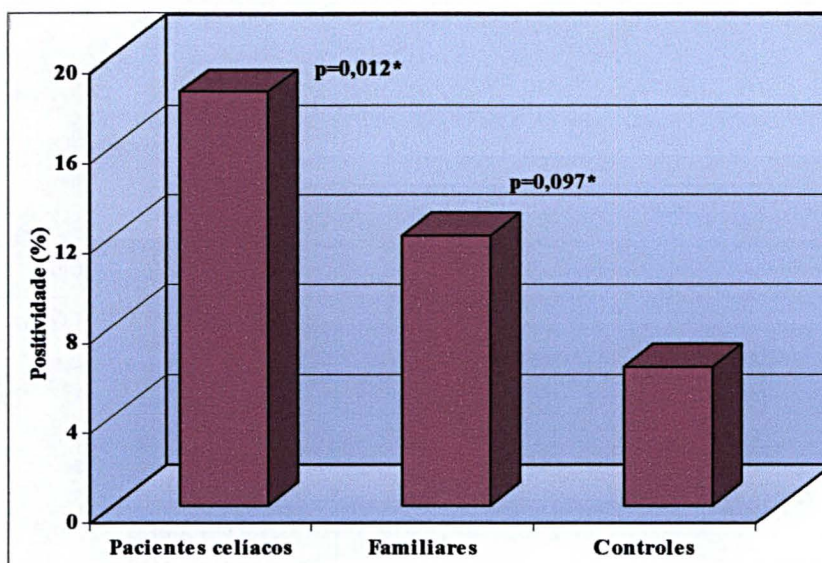
Dentre os pacientes celíacos, 18,42% (14/76) foram positivos para pelo menos um dos auto-anticorpos analisados, caracterizando significativa diferença ($p=0,012$) em relação à positividade de 6,18% (6/97) obtida no grupo controle (gráfico 11). Nos familiares de celíacos obteve-se 12,0% (18/150) de positividade para os auto-anticorpos, não atingindo níveis de significância na comparação com os controles ($p=0,097$) e com os pacientes celíacos ($p=0,135$).

A tabela 14 detalha a positividade obtida para cada um dos auto-anticorpos nos três grupos em estudo. Em cinco pacientes e em dois familiares foram detectados mais de um auto-anticorpo simultaneamente. Nos pacientes celíacos o perfil de auto-anticorpos caracterizou 3,95% (3/76) de positividade para os AML; 7,9% (6/76) para os ANA; 2,63% (2/76) para os anticorpos anti-CGP e 10,52% (8/76) para os AAM. Os anticorpos AMA e LKM não foram detectados nas amostras de pacientes celíacos. Comparando-se com o grupo controle, obteve-se significativa diferença na positividade apenas para ANA

(7,9%, 6/76 nos pacientes x 0%, 0/97 nos controles; $p=0,0064$). Nos familiares de celíacos, a diferença de positividade para ANA foi próxima da significância em relação aos controles (3,33%, 5/150 nos familiares x 0%, 0/97 nos controles; $p=0,080$). A comparação entre pacientes e familiares não mostrou significância para nenhum dos auto-anticorpos (tabela 14).

As reações positivas para os auto-anticorpos apresentaram títulos de fluorescência que variaram de 1:20 a 1:80 (ANA), 1:20 a 1:40 (AML), 1:10 à 1:80 (AAM) e 1:40 à 1:80 (CGP).

GRÁFICO 11 - POSITIVIDADE DOS AUTO-ANTICORPOS NOS GRUPOS EM ESTUDO



NOTAS: * p relativo aos controles
 Pacientes x familiares: $p=ns$

TABELA 14 - FREQUÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS EM PACIENTES CELÍACOS, FAMILIARES E CONTROLES

AUTO-ANTICORPOS	Pacientes (n=76)	Familiares (n=150)	Controles (n=97)	<i>p</i> * Pacientes x controles	<i>p</i> * Familiares x controles	<i>p</i> * Pacientes x familiares
N (%)						
AML	3 (3,95)	2 (1,33)	2 (2,06)	ns	ns	ns
AMA	0 (0)	0 (0)	0(0)	-	-	-
LKM	0(0)	0(0)	0(0)	-	-	-
ANA	6 (7,9)	5 (3,33)	0 (0)	0,0064	0,080	ns
CGP	2 (2,63)	3 (2,0)	0 (0)	ns	ns	ns
AAM	8 (10,52)	10 (6,66)	4 (4,12)	0,090	ns	ns
TOTAL	14 (18,42)	18 (12)	6 (6,18)	0,012	0,097	0,135

NOTAS: AML: anticorpo antimúsculo liso; AMA: antimitocôndria; LKM: antimicrosoma de fígado e rim; ANA: antinuclear; CGP: anticélula gástrica parietal; AAM: antimicrosomal tireoideano.

ns= não significante a nível de 0,05

* Teste exato de Fisher

5.5.2 Fenótipos e Alelos de BF nos Pacientes Celíacos, em Relação à Presença de Auto-Anticorpos

Não foi observada diferença significativa na frequência dos fenótipos de BF ao comparar-se os pacientes com auto-anticorpos (14/76) com aqueles sem auto-anticorpos (62/76) (tabela 15). A comparação da distribuição dos fenótipos e alelos de BF entre esses dois grupos e os controles (tabela 16), mostrou uma diminuição do alelo BF*F nos

pacientes com auto-anticorpos em relação aos controles (14,3%, 2/14 nos pacientes x 41,2%, 40/97 nos controles; $p=0,044$), embora o valor de p , quando corrigido, não tenha mantido a significância ($p=0,132$).

Os anticorpos antinucleares (ANA), que caracterizaram significativa diferença na positividade entre pacientes e controles ($p=0,0064$; tabela 14), não mostraram diferença na distribuição dos fenótipos de BF, ao comparar os pacientes ANA positivos com os pacientes ANA negativos ($p=ns$; tabela 17).

A comparação da frequência dos fenótipos e alelos de BF dos pacientes ANA positivos e ANA negativos, com a dos controles (tabela 18), mostrou resultados similares aos obtidos com os anticorpos totais (tabela 16), com diminuição do alelo BF*F nos pacientes ANA positivos (0%, 0/6 nos pacientes x 41,2%, 40/97 nos controles; $p=0,047$; $pc=0,141$).

TABELA 15 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF ENTRE PACIENTES CELÍACOS COM AUTO-ANTICORPOS E SEM AUTO-ANTICORPOS

FENÓTIPO BF	PACIENTES CELÍACOS		p (Fisher)
	Com auto-anticorpos (N=14)	Sem auto-anticorpos (N=62)	
SF	2	18	ns
S	9	33	ns
F	0	4	ns
SS07	1	3	ns
SF1	2	3	ns
F1S07	0	1	ns

NOTA: ns= não significante a nível de 0,05

TABELA 16 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALELOS DE BF DOS PACIENTES CELÍACOS COM AUTO-ANTICORPOS E SEM AUTO-ANTICORPOS, COM OS CONTROLES

FENÓTIPO BF	Controles (n=97)	Pacientes com auto-anticorpos (n=14)	Pacientes sem auto-anticorpos (n=62)
SF	34	2 (ns)	18 (ns)
S	51	9 (ns)	33 (ns)
F	2	0 (ns)	4 (ns)
SS07	3	1 (ns)	3 (ns)
SF1	3	2 (ns)	3 (ns)
FF1	2	0 (ns)	0 (ns)
FS07	2	0 (ns)	0 (ns)
F1S07	0	0 (ns)	1 (ns)

ALELO BF			
S	91	14 (ns)	57 (ns)
F	40	2 (0,044)*	22 (ns)
F1	5	2 (ns)	4 (ns)
S07	5	1 (ns)	4 (ns)

NOTAS: ns= não significativa a nível de 0,05

*p= 0,044; pc= 0,132

TABELA 17 – COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF ENTRE PACIENTES CELÍACOS ANA POSITIVOS E ANA NEGATIVOS

FENÓTIPO BF	Pacientes ANA positivos (n=6)	Pacientes ANA negativos (n=70)	p (Fisher)
SF	0	20	ns
S	4	38	ns
F	0	4	ns
SS07	1	3	ns
SF1	1	4	ns
F1S07	0	1	ns

NOTAS: ANA= anticorpo antinuclear

ns= não significativa a nível de 0,05

TABELA 18 - DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALELOS DE BF NOS PACIENTES CELÍACOS ANA POSITIVOS E ANA NEGATIVOS, EM RELAÇÃO AOS CONTROLES

FENÓTIPO BF	Controles (n=97)	Pacientes ANA positivos (n=6)	Pacientes ANA negativos (n=70)
SF	34	0 (ns)	20 (ns)
S	51	4 (ns)	38 (ns)
F	2	0 (ns)	4 (ns)
SS07	3	1 (ns)	3 (ns)
SF1	3	1 (ns)	4 (ns)
FF1	2	0 (ns)	0 (ns)
FS07	2	0 (ns)	0 (ns)
F1S07	0	0 (-)	1 (ns)
ALELO BF			
S	91	6 (ns)	65 (ns)
F	40	0 (0,047)*	24 (ns)
F1	5	1 (ns)	5 (ns)
S07	5	1 (ns)	4 (ns)

NOTAS: ANA= anticorpo antinuclear

ns= não significante a nível de 0,05

*p= 0,047; pc= 0,141

5.5.3 Fenótipos e Alelos de BF nos Familiares de Celíacos, em Relação à Presença de Auto-Anticorpos

Os familiares de celíacos mostraram 12% (18/150) de positividade para os auto-anticorpos estudados (gráfico 11). Não houve diferença significativa na distribuição dos fenótipos de BF ao se comparar os familiares com auto-anticorpos (18/150) com aqueles sem auto-anticorpos (132/150) (tabela 19).

O quadro 6 sumariza as principais associações entre os fenótipos e alelos de BF e a DC, observadas no presente estudo.

TABELA 19 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF ENTRE FAMILIARES DE CELÍACOS COM AUTO-ANTICORPOS E FAMILIARES SEM AUTO-ANTICORPOS

FENÓTIPO BF	FAMILIARES DE CELÍACOS		
	Com auto-anticorpos (n=18)	Sem auto-anticorpos (n=132)	p (Fisher)
SF	3	24	ns
S	13	95	ns
F	1	1	ns
SS07	0	4	ns
SF1	1	7	ns
FF1	0	1	ns

NOTA: ns= não significante a nível de 0,05

QUADRO 6 - SINOPSE DAS PRINCIPAIS ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS NO PRESENTE ESTUDO

FENÓTIPOS E ALELOS	GRUPO DE COMPARAÇÃO	p (FISHER)
↑ BF S nos familiares	Controles normais	0,001; pc= 0,003
↓ BF SF nos familiares	Controles normais	0,002; pc= 0,006
↓ BF*F nos familiares	Controles normais	0,0003; pc= 0,0009
↓ BF S nos pacientes	Familiares	0,026; pc= 0,078
(↑) BF SF nos pacientes	Familiares	0,065; pc= 0,195
↓ BF S nos pacientes	"Familiares EmA-"	0,020; pc= 0,060
(↑) BF SF nos pacientes	"Familiares EmA-"	0,058; pc= 0,174
↑ BF S nos familiares do sexo feminino	Pacientes do sexo feminino	0,023; pc= 0,069
↑ BF S nos familiares do sexo feminino	Controles do sexo feminino	0,0048; pc= 0,0144
↓ BF SF nos familiares do sexo feminino	Controles do sexo feminino	0,0041; pc= 0,0123
↓ BF*F nos familiares do sexo feminino	Controles do sexo feminino	0,0022; pc=0,0066
↓ BF*F nos pacientes com auto-anticorpos	Controles normais	0,044; pc=0,132
↓ BF*F nos pacientes com ANA	Controles normais	0,047; pc=0,141
↑ = frequência aumentada	↓ = frequência diminuída	
(↑) = tendência ao aumento da frequência	ANA = anticorpo antinuclear	

6 DISCUSSÃO

Os genes da região HLA controlam diversas funções envolvidas com a resposta imunológica e influenciam a susceptibilidade à numerosas afecções (THOMSON, 1995). Dentre as doenças complexas, a DC apresenta a mais forte associação, com a molécula HLA-DQ2 presente em 90-95% dos pacientes, quando comparado a 20-30% da população sadia, principalmente de origem européia (PENA; GARROTE; CRUSIUS, 1998). Dado o papel inquestionável da gliadina em conduzir à inflamação e autoimunidade na DC, essa serve como um modelo de doença com características autoimunes, para a qual o gatilho (gliadina), a associação genética (HLA-DQ2 ou HLA-DQ8) e a resposta humoral autoimune específica (auto-anticorpos anti-tTG) são conhecidos (SCHUPPAN, 2000).

Entretanto, apesar dos inúmeros avanços nos conhecimentos da imunopatogenia da DC, ainda não se explica exatamente quais pessoas com o alelo DQ2 vão desenvolver a doença e por que a maioria dos indivíduos com tal marcador não a desenvolvem (ALDERSLEY et al., 2000). De encontro a esses aspectos é totalmente pertinente a afirmação de diferentes autores de que a DC não resulta do defeito de um só gene, e sim do efeito combinado de diferentes produtos gênicos normalmente funcionantes, aliado à forte influência dos fatores ambientais (HORVATH; MEHTA, 2000; MOLBERG, 2000). Segundo SOLLID (2000), muitos genes predisponentes à DC ainda estão para ser identificados. A existência de um verdadeiro espectro de estágios patológicos observados na DC é compatível com uma natureza poligênica, já que diferentes genes de susceptibilidade podem contribuir nos diferentes estágios para o desenvolvimento final da doença. É possível que esses aspectos estejam diretamente envolvidos na diversidade de expressão da doença tanto entre indivíduos não relacionados, assim como dentro de uma mesma família. As heterogeneidades clínica, histológica e imunológica, além da concomitância ou não com outras doenças autoimunes, observada tanto nos pacientes

como nos familiares de celiacos, reforçam tais observações e salientam a força da influência genética na doença (COLLIN; KAUKINEN; MÄKI, 1999).

O importante aumento da frequência de determinadas variantes genéticas de componentes do complemento, principalmente daqueles codificados por genes da região de classe III do sistema HLA (C2, C4A, C4B, BF) em inúmeras doenças, com predomínio naquelas de caráter autoimune, sugere que tais variantes participam, efetivamente, do mecanismo etiopatogênico dessas enfermidades, decorrente das propriedades biológicas específicas das diferentes variantes.

SOLLID et al. (2001) ressaltam que o controle da resposta imune ao glúten pelas células T restritas à moléculas DQ2 ou DQ8 representa um ponto crítico para o **desenvolvimento** da DC e poderia explicar o papel genético dominante do HLA na doença. Os autores ressaltam, porém, que os produtos de outros genes predisponentes à doença podem participar, efetivamente, nas vias que levam à **formação** da lesão.

6.1 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE BF EM PACIENTES COM DC, FAMILIARES E CONTROLES

Embora os avanços recentes tenham facilitado a caracterização dos alelos do complemento a nível molecular, verifica-se que os estudos do polimorfismo de BF, em populações ou doenças, são, predominantemente, realizados à nível de alotipagem protéica. De acordo com PRODINGER et al. (1999), a fenotipagem tem a vantagem, dependendo do método aplicado, de que a presença e até mesmo a atividade funcional da proteína codificada pelo alelo pode ser confirmada. A genotipagem, além de não permitir a identificação de alelos nulos ou silenciosos, não detecta a atividade funcional das variantes. Em um estudo como o presente, em que a via alternativa e o BF têm papel fundamental na patogenia da doença e no processo de formação da lesão, a confirmação da expressão da proteína e a caracterização das diferentes variantes tornam-se fundamentais na análise de associação dessas com a susceptibilidade e a gravidade da

doença. Neste aspecto, um exemplo a citar seria o componente C4 do complemento. Os genes C4A e C4B humanos são altamente polimórficos, porém a presença de alelos nulos é muito freqüente (10-12%) (RITTNER et al., 1992). Os alelos nulos de C4 (C4Q0) são definidos pela ausência da proteína no plasma. De acordo com LAMBRIS, SAHU e WETSEL (1998), embora a maioria desses casos seja decorrente da deleção de genes, aproximadamente 40% são devido à não expressão de genes não alterados. Segundo os autores, é possível que essa variação na expressão de C4 possa decorrer do polimorfismo das proteínas regulatórias.

Na busca de fatores genéticos de risco adicionais, em que o efeito dos genes pode ser moderado ou sutil, os estudos em família são os mais recomendados. Estes, além de permitirem a comparação das frequências gênicas e do *locus* marcador ou candidato entre as amostras de indivíduos afetados e não afetados dentro da família, evitam problemas de estratificação da população, que podem ocorrer ao utilizar-se apenas controles com indivíduos não relacionados.

O presente trabalho trata da associação entre a proteína BF do sistema complemento e a DC, visando demonstrar uma possível influência imunogenética dessa proteína na susceptibilidade e na gravidade da DC. Para tanto, foi realizado um amplo estudo, em que foram determinados os alótipos de BF em 76 pacientes celíacos, 150 familiares (47 famílias) e em 97 indivíduos sadios da população.

Vários estudos de associação entre o polimorfismo de BF e doenças têm sido descritos nos últimos anos (FIELDER et al., 1981; DYER et al., 1980; ALLANNIC et al., 1985; NISHIMUKAI et al., 1991; WATZKO; MESSIAS, 1994). Especificamente em relação à DC, foram encontrados relatos na literatura de apenas três estudos realizados em pacientes americanos de origem caucasóide (ALPER et al., 1987), irlandeses (MANNION et al., 1993) e italianos (MALAVASI et al., 1980). Desses, foram avaliados apenas familiares dos caucasóides (n=24) e irlandeses (n=10).

Até o momento, nenhum estudo de associação entre o polimorfismo do complemento com a DC foi realizado em pacientes celíacos brasileiros e familiares. A

busca de associação dos fenótipos de BF com a gravidade da doença e com a presença de outros auto-anticorpos, conforme realizado na presente investigação, não foi motivo de avaliação nos três relatos citados.

As frequências gênicas de BF encontradas nesse estudo, no grupo controle (tabela 3), encontram-se de acordo com aquelas observadas na literatura, em relação à população caucasóide (ALPER; BOENICH; WATSON, 1972) e também são concordantes com os dados relatados por MESSIAS et al. (1994) em um estudo realizado com 225 indivíduos sadios do sul do Brasil. Destaca-se, no caso, apenas uma elevação na frequência gênica de BF*F1 nas amostras deste trabalho, em relação as da autora citada (0,026 vs 0,003), possivelmente relacionada à própria seleção dos controles. Algumas diferenças observadas ao se comparar com pesquisas em outras populações caucasóides e sadias, principalmente em relação à frequência de alelos raros, podem ser inerentes às próprias diferenças populacionais e de áreas geográficas (TRILANTAPHYLLIDIS et al., 1989; STANEKOVA; STARSIA; NIKS, 1990).

No presente estudo, a comparação da distribuição dos fenótipos e alelos de BF entre os pacientes com DC e os indivíduos controles não evidenciou diferença estatística significativa entre os mesmos (tabelas 2 e 3; gráfico 1). Esses resultados diferem daqueles obtidos por MALAVASI et al. (1980) que verificou, em um estudo com 44 pacientes celíacos italianos, comparados com indivíduos sadios da população, um aumento significativo do alelo BF*F1 ($p < 0,037$; $RR=4$) e do fenótipo BF SF ($p < 0,035$), apesar do aumento do alelo BF*F não atingir significância estatística. ALPER et al. (1987), por outro lado, mostrou significativa diferença na frequência dos haplótipos HLA-B8, DR3, SC01 e HLA-B44, DR7, FC31 ao comparar 24 pacientes americanos, de origem caucasóide, com controles normais, assim como com os respectivos familiares. Esses dados demonstram diferenças na expressão do polimorfismo de BF entre os pacientes, dependendo da população estudada, cabendo ressaltar o aspecto heterogêneo de algumas dessas populações, como é o caso da brasileira. MANNION et al. (1993) avaliaram

haplótipos da região HLA em 10 pacientes celíacos irlandeses e familiares, porém não os compararam com a população normal.

Os estudos de associação do polimorfismo de BF com outras doenças também têm caracterizado divergências nas variantes indicativas de maior susceptibilidade ou resistência às doenças nas populações de diferentes origens étnicas e geográficas. O alelo BF*F1 tem sido associado a maior susceptibilidade ao desenvolvimento do diabetes mellitus insulino-dependente em pacientes africanos (ORREN; PRESCOTT, 1983), alemães (BERTRAMS et al., 1980), franceses (ALLANNIC et al., 1985) e bascos (DE MOUZON et al., 1979), entre outros, com alguns estudos com associações mostrando diferenças em relação à idade de início da doença. Por outro lado, em pacientes diabéticos japoneses, foi observada uma significativa diminuição do alelo BF*F, além da caracterização de uma variante rara, BF FT, associada ao HLA-DR3 (TOKUNAGA et al., 1982).

Em pacientes brasileiros com artrite reumatóide, WATZKO e MESSIAS (1994) detectaram diminuição significativa do fenótipo BF SF em pacientes com classe funcional III e IV (mais graves), enquanto LANCHBURY, PAL e PAPIHA (1987) observaram, em pacientes ingleses, além da diminuição do fenótipo BF SF, aumento significativo de BF SS em pacientes com artrite reumatóide positivos para o fator reumatóide, estabelecendo inclusive uma associação desse fenótipo com a susceptibilidade e/ou gravidade da doença.

Os estudos de associação com os antígenos HLA de classe I e classe II e a DC também têm demonstrado diferenças significativas conforme a origem das populações analisadas. Tais aspectos ficaram bastante evidentes na associação da DC com o haplótipo B8-DR3 em pacientes americanos (ALPER et al., 1987) e com o haplótipo B18-DR3 em pacientes da Sardenha (CONGIA et al., 1992). A característica marcante da associação do *locus* DP (classe II) na DC parece, justamente, ser a variabilidade entre populações, destacando-se os alelos DPB1*0402 e DPB1*0301 em pacientes italianos (BUGAWAN et al., 1989; COLONNA et al., 1990) e DPB1*0101 e DPB1*0301 em norte americanos (KAGNOFF et al., 1989).

Em todos os estudos anteriormente citados os grupos controles eram compostos por indivíduos sadios da população, sendo com grande frequência doadores de banco de sangue.

No presente estudo, embora a comparação da distribuição dos fenótipos e alelos de BF entre os pacientes e controles não tenha mostrado diferenças significativas, o estudo nos familiares dos pacientes foi fundamental na caracterização das associações.

Dentre os 76 pacientes com DC, foi possível estudar as famílias de 47 desses, através de 150 familiares. A comparação das variantes fenotípicas de BF entre esses familiares e o grupo controle da população sadia mostrou significância estatística no aumento do fenótipo BF S ($p=0,001$) e na diminuição de BF SF ($p=0,002$) e do alelo BF*F ($p=0,0003$) nos familiares. Essas diferenças se mantiveram acentuadas, mesmo após a correção para o número de alelos testados (gráfico 2; tabela 5).

Tais dados chamam a atenção e mostram que os familiares de celiacos são diferentes dos indivíduos normais quanto à expressão do polimorfismo de BF.

Neste contexto, ao ampliar-se a análise, observou-se que essas diferenças também se mantiveram tanto no grupo denominado família completa ($n=197$; gráfico 3; tabela 5), como naquele de "familiares EmA-" ($n=127$; gráfico 2; apêndice 4), corroborando os achados obtidos.

Nos dois relatos da literatura envolvendo o polimorfismo de BF em pacientes celiacos e familiares, MANNION et al. (1993) não realizaram comparações com os indivíduos da população normal e ALPER et al. (1987) detectaram dois haplótipos com maior frequência nos pacientes, em relação aos controles e familiares, não observando diferença significativa ao comparar familiares e população normal. É possível que essas diferenças, em relação aos resultados do presente estudo, estejam relacionadas tanto à população estudada como ao número de amostras analisadas pelos autores. ALPER et al. (1987) analisaram 24 pacientes e 59 familiares, enquanto neste estudo foram avaliados 47 pacientes e 150 familiares.

Por outro lado, a distribuição dos fenótipos de BF entre os pacientes com DC (n=47) e os respectivos familiares (gráfico 5) demonstrou uma diminuição significativa na frequência do fenótipo BF S nos pacientes ($p=0,026$), além de uma maior tendência dos pacientes a apresentar o fenótipo BF SF ($p=0,065$). Esse fato ressalta a importância de estudos de associação genética entre pacientes e os próprios familiares sadios, pois além destes apresentarem um mesmo arsenal genético, de maneira geral foram expostos a fatores ambientais semelhantes, e criados, quase sempre, dentro de uma condição sócio-econômica e área geográfica similares. Assim, associações significantes detectadas através deste tipo de comparação poderiam, certamente, indicar marcadores mais específicos de desenvolvimento da doença.

A análise dos resultados obtidos indica uma diminuição significativa da homozigose para BF S ($p=0,026$) nos pacientes, quando comparados aos familiares, além de maior tendência à heterozigose, próxima da significância, para BF SF ($p=0,065$; $RR=1,93$). É provável que, com o aumento do número de amostras de pacientes e familiares, a tendência observada acentue-se, pois a comparação com o total dos pacientes (n=76), apesar de não se ter os familiares de 29 desses, além de evidenciar resultados similares, com diminuição significativa na frequência de BF S ($p=0,009$) e aumento próximo da significância de BF SF, já demonstrou aumento significativo do alelo BF*F ($p=0,040$; $pc=0,12$). Esses resultados sugerem que tanto o fenótipo BF SF como o alelo BF*F poderiam ser marcadores de susceptibilidade, enquanto o fenótipo BF S poderia ter um caráter protetor no desenvolvimento da DC entre os familiares.

Esse aspecto sugere que o alelo BF*F, em heterozigose com BF*S (BF SF) pode representar, na verdade, o maior fator de risco à DC, associado ao polimorfismo de BF na população brasileira, nos indivíduos portadores desse alelo dentro da família de celiacos.

Desta forma, observa-se que as comparações dentro do núcleo familiar evidenciaram um comportamento diferente para BF S em relação àquele obtido com a população sadia, que as análises até o momento ainda não permitiram esclarecer totalmente.

Enquanto a comparação familiar versus controles sugere a heterozigose para BF SF como um fator de proteção nos indivíduos sadios da população, é possível que dentro do núcleo familiar a presença de BF SF, aliada aos fatores ambientais e à presença de outros genes (doença poligênica), passa verdadeiramente a representar um fator predisponente à doença.

Deve-se considerar, no entanto, que mutações pontuais podem estar ocorrendo tanto no fenótipo S como F, que embora sem alterar a mobilidade eletroforética, poderiam estar alterando a função da proteína com tais fenótipos.

MALAVASI et al. (1980), estudando pacientes celíacos italianos (n=44), observaram um aumento do alelo BF*F1 ($p<0,037$; $RR=4$). Esses autores também obtiveram um aumento significativo de BF SF ($p<0,035$) e, próximo da significância para o alelo BF*F ($p=0,065$). Porém esses dados foram obtidos em comparação com o grupo controle, não tendo sido realizado um estudo com familiares. A determinação paralela dos antígenos HLA permitiu aos autores observarem que todos pacientes BF*F1 (n=6) também eram Dw3 e que 21 dos 27 pacientes BF*F eram Dw7. Tais dados foram concordantes com os achados prévios de DAUSSET et al. (1978), caracterizando uma associação de BF*F1 com Dw3 e BF*F com Dw7.

Os estudos de ALPER et al. (1987) com 24 pacientes celíacos americanos, de origem caucasóide, e seus respectivos familiares (pai e mãe), evidenciaram um aumento significativo de dois haplótipos estendidos, HLA-B8, DR3, BF*S, C2*C, C4A*Q0, C4B*1 (HLA-B8, DR3, SC01) e HLA-B44, DR7, BF*F, C2*C, C4A*3, C4B*1 (HLA-B44, DR7, FC31) nos pacientes com DC, tanto em relação aos familiares sadios como aos controles normais da população. Esses autores caracterizaram, na análise entre pacientes e controles, um risco relativo de 12,9 para o haplótipo HLA-B8, DR3, SC01 e 13,4 para o haplótipo HLA-B44, DR7, FC31. Exceto para DR3 ($RR=15,9$) e SC01 ($RR=11,4$), os riscos relativos isolados dos demais marcadores eram bem menores, tais como DR7 ($RR=3,7$), B44 ($RR=2,3$), FC31 ($RR=2,6$), BF*F ($RR=2,0$), entre outros. Em relação ao HLA-DR3 e HLA-DR7 os autores observaram, nos pacientes, uma elevação das formas

heterozigotas (DR3/DR7) em relação aos homozigotos, porém não fazem tal referência para os fenótipos de BF.

Os dados de MALAVASI et al. (1980) e ALPER et al. (1987) evidenciam diferenças quanto aos achados. No oeste da Irlanda, onde se tem alta prevalência de DC, um estudo similar com 10 famílias não relacionadas caracterizou aumento apenas do haplótipo HLA-B8, DR3, DQW2, BF*S, C4A*Q0, C4B*1 nos pacientes em relação aos familiares. Os autores enfatizam que a população celíaca do oeste da Irlanda apresenta marcadores do MHC que diferem, discretamente, dos dados de outras populações estudadas e que tais diferenças podem ser observadas quando estes migram para outros países (MANNION et al., 1993). É possível que o pequeno número de famílias (N=10) de tal estudo, em relação à amostragem de ALPER et al. (1987) (N=24) e do presente estudo (N=47), tenha refletido na ausência de associação do alelo BF*F e a DC, embora se tenha que considerar a heterogeneidade das populações estudadas.

Gradualmente, os estudos de associação com DC deram ênfase à participação da molécula DR7 na susceptibilidade à doença (BETUEL et al., 1980; TRABACE et al., 1984), ressaltando a freqüente heterozigose com DR3 (DR3/DR7) e o alto risco relativo (RR=11,4) que esse haplótipo representa (MEARIN et al., 1983). De acordo com KING e CICLITIRA (2000), o maior risco relativo de desenvolver DC é observado em indivíduos que têm o DR7 em combinação com DR3. Os autores sugerem a possibilidade de que outro gene no haplótipo DR7 esteja influenciando a susceptibilidade à DC. A tendência ao aumento da heterozigose BF SF ($p=0,065$) nos pacientes do presente estudo vem de encontro a tais observações, e chama a atenção para o alelo BF*F compondo um haplótipo de alto risco para a DC, juntamente com DR7 (HLA-B44, DR7, FC31; RR=13,4), conforme descrito por ALPER et al. (1987).

LIE et al. (1999) reforçam tais aspectos ao citar diversos estudos indicando que indivíduos HLA-DQ2 positivos, carregando tanto DR3/DR7 como DR5/DR7, têm alto risco de desenvolver a DC. Os autores, em um estudo com pacientes celíacos da Noruega e Suécia, demonstraram que o alelo 3, do microsatélite D6S2223, dentro ou próximo ao

complexo HLA, telomérico ao HLA-F, apresenta uma associação negativa com a DC em pacientes homozigotos para o haplótipo DR3. O achado de um novo gene, fora da região de classe II, influenciando a susceptibilidade à DC, vem reforçar a explicação por que diferentes constelações de haplótipos que abrigam os alelos de susceptibilidade DQA1*0501 e DQB1*0201 conferem diferentes riscos à doença. Sabe-se que a composição e a frequência relativa dos vários haplótipos DR-DQ diferem nas diferentes populações.

Ainda neste contexto, LOPEZ-VAZQUEZ et al. (2002), em um estudo com 133 pacientes espanhóis, observaram um aumento significativo do haplótipo DR7/DQ2 em pacientes que desenvolveram as formas típicas da DC em relação às atípicas (subclínicas, oligossintomáticas ou assintomáticas), assim como a presença do haplótipo HLA-B8, DR3, DQ2 significativamente associada às formas atípicas. Os genes MICA E MICB, da região de classe I do MHC, codificam proteínas HLA não-clássicas, expressas principalmente no enterócito, sob condições de estresse. Os autores mostraram uma associação das formas atípicas da DC com o alelo MICA-A5.1 e sugerem que esse alelo confere um efeito aditivo ao haplótipo DR3/DQ2 que pode modular o desenvolvimento da DC.

Todos os aspectos anteriormente colocados corroboram a característica poligênica da DC e destacam a diversidade de marcadores encontrados nas populações oriundas de diferentes áreas geográficas, bem como a variabilidade no efeito dos mesmos, algumas vezes conferindo maior resistência à doença ou até mesmo uma forma menos grave.

ALPER et al. (1987), ao caracterizarem os dois haplótipos de maior associação com a DC em pacientes caucasóides, incluindo a presença do alelo BF*F compondo um haplótipo de susceptibilidade à DC com a molécula DR7, sugeriram que o HLA-DR3 ou DR7, por si só, não eram genes de susceptibilidade à DC, e sim marcadores para tais genes em haplótipos estendidos. Quinze anos depois, LOPEZ-VAZQUEZ et al. (2002) ainda afirmam que outros genes, em adição aos haplótipos de classe II codificados por DQA1*0501/ DQB1*0201 e presentes no haplótipo HLA-B8, DR3, DQ2 e/ou HLA-

DR7/DQ2, podem contribuir na predisposição genética à DC e explicar as associações observadas nas diferentes populações.

Neste contexto, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a presença do fenótipo BF SF (alelo BF*F) possa constituir um dos fatores que podem contribuir na predisposição genética à DC da população brasileira, associados, possivelmente, a genes HLA. Um estudo recente com 25 pacientes celíacos, de Ribeirão Preto (São Paulo), de origem predominantemente caucasóide, caracterizou uma frequência significativamente elevada dos alelos HLA DRB1*03, DRB1*07 e DQB1*02 nestes, em relação aos controles sadios, com o haplótipo DRB1*03/DQB1*02 conferindo um risco relativo de 7.47 e o haplótipo DRB1*07/DQB1*02 um risco relativo de 20 (SILVA et al., 2000). Ainda assim, somente com o aumento do número de amostras de familiares e com um estudo completo de associação com as moléculas HLA de classe II e classe III (C4A, C4B e C2) nos pacientes e familiares seria possível montar os haplótipos destes indivíduos e poder afirmar que o alelo BF*F compõe, juntamente com DR7/DQ2, um haplótipo de alto risco para o desenvolvimento da DC no meio brasileiro. O alto custo de tais determinações em um número elevado de amostras como neste estudo inviabilizou tal análise até o momento.

CRAWFORD e ALPER (2000) corroboram os aspectos abordados ao mostrarem, em uma relação dos 14 haplótipos mais comuns na população europeia caucasóide, a presença do alelo BF*F em apenas dois destes: HLA-B44, FC31, DR7, DQ2 e HLA-B35, FC(3,2), DR1, DQ1. Enquanto o primeiro haplótipo mostra uma importante associação com a DC (ALPER et al., 1987), nenhum estudo, até o momento, evidenciou relação da DC com o segundo haplótipo apresentado.

6.2 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE BF NOS "FAMILIARES EmA+"

Os dados obtidos com o grupo denominado "familiares EmA+" estão de acordo com inúmeros aspectos já abordados. A triagem sorológica através do anticorpo anti-

endomísio destacou esses indivíduos (n=23) dos demais familiares, por apresentarem reações positivas, porém com títulos significativamente baixos em relação aos pacientes ($p=0,0004$; tabela 9). A confirmação do diagnóstico de DC através de biópsia intestinal foi obtida em 11 desses familiares, evidenciando predomínio do grau II de alterações (tabela 11; apêndice 3). Tais dados caracterizam uma forma branda, ou não clássica da doença, similar à que tem sido descrita com frequência nos estudos com familiares de celiacos de outros países ou estudos (HERVONEN et al., 2002; MUSTALAHTI et al., 2002). Os outros familiares, por recusarem biópsia, ainda não têm diagnóstico confirmado de DC, porém foram analisados no conjunto com o grupo de "familiares EmA+", pelas alterações sorológicas e clínicas que apresentavam, inclusive com melhora clínica após retirada do glúten alimentar.

A análise dos fenótipos e alelos de BF no grupo de "familiares EmA+" não mostrou diferença significativa dos controles, pacientes ou "familiares EmA-" (gráfico 4; apêndice 4). Enquanto nos pacientes observou-se uma diminuição significativa na frequência do fenótipo BF S em relação aos familiares totais (55,3% x 72%; $p=0,026$) e uma tendência de aumento de BF SF (29,8% x 18%; $p=0,065$), nos "familiares EmA+" a diminuição na frequência de BF S, em relação aos "familiares EmA-" (65,2% x 73,2%) e o aumento de BF SF (21,7% x 17,3%) não foram tão acentuados como verificado com os pacientes. Esse resultado sugere esse grupo com características "intermediárias" entre os familiares e pacientes, no qual se destaca maior frequência de BF S em relação aos pacientes (65,2% x 55,3%). Dentre os 23 "familiares EmA+", 15 apresentam o fenótipo BF S (65,2%) e 5 o fenótipo BF SF (21,7%). Embora esses familiares tenham sorologia positiva e alguma alteração clínica ou histológica, não prevalece o fenótipo predisponente à doença (BF SF), possivelmente representando um fator adicional na manifestação de formas atípicas ou monossintomáticas. Prevalece o fenótipo que sugere proteção nos familiares (BF S), embora sem atingir significância estatística. No entanto, deve-se considerar a pequena amostragem que esses representam (23/150).

Segundo ALPER et al. (1987), dentre os dois haplótipos mais frequentes na DC, o HLA-B8, DR3, BF*S, C2*C, C4A*Q0, C4B*1 apresenta um risco relativo discretamente menor (12,9) que o haplótipo HLA-B44, DR7, BF*F, C2*C, C4A*3, C4B*1 (RR=13,4). Cabe aqui ressaltar a presença do alelo BF*S compondo um haplótipo juntamente com o HLA-B8, DR3, conforme também foi observado nos estudos de MANNION et al. (1993) (HLA-B8, DR3, DQW2, BF*S, C4A*Q0, C4B*1) com pacientes irlandeses. Na população brasileira, SILVA et al. (2000) demonstraram um RR=7,47 para o haplótipo DRB1*03/DQB1*02 (DR3/DQ2) e RR=20 para o haplótipo DRB1*07/DQB1*02 (DR7/DQ2). A análise do polimorfismo de BF, C2 e C4 nesses haplótipos ainda está para ser determinada.

A análise desses dados, no contexto daqueles obtidos por LIE et al. (1999), demonstrando que o alelo 3 do microssatélite D6S2223 confere resistência à DC em pacientes homozigotos para o haplótipo DR3, e nos resultados recentes e inéditos de LOPEZ-VAZQUEZ et al. (2002), associando significativamente o haplótipo HLA-B8, DR3, DQ2 e o alelo MICA-A5-1 às formas atípicas da DC, leva a importantes reflexões sobre aqueles pacientes que apresentam formas menos típicas da doença, assim como os familiares assintomáticos ou monossintomáticos caracterizados nos estudos de triagem.

De acordo com CRAWFORD e ALPER (2000), o haplótipo estendido de maior frequência em indivíduos caucasóides europeus é o HLA-B8, SC01, DR3. MANNION et al. (1993) enfatizam, porém, que as diferenças nos haplótipos podem constituir a base dos diferentes efeitos genéticos dos *loci* ligados ao MHC, observados entre pacientes celíacos de diferentes populações. É provável que esta também seja a base das diferenças observadas entre as formas típicas e atípicas da doença, característica tanto entre indivíduos não relacionados, assim como entre os de uma mesma família.

Segundo SOLLID et al. (2000), o conjunto de dados disponíveis atualmente não deixa dúvida que a susceptibilidade à DC está associada primariamente às moléculas HLA-DQ2 e, em menor proporção, à DQ8. Os autores colocam, porém, que um aspecto ainda a esclarecer é que moléculas adicionais codificadas por genes HLA não

identificados também contribuem na predisposição genética à DC. Na opinião desses, entretanto, qualquer efeito desses genes adicionais será, provavelmente, moderado.

Possivelmente, somente através de estudos colaborativos internacionais será possível caracterizar, de maneira ampla, se dentre os dois haplótipos de maior associação com a DC, aqueles compostos pelo HLA-B8, DR-3, BF*S, alelo 3 (D6S2223) e MICA-A5.1, independente da população estudada, estariam efetivamente associados às formas não-típicas da doença (assintomáticas, monossintomáticas). Caberia ainda esclarecer se a homozigose (B8, DR3, BF S) e a heterozigose (DR3-DR7, DR5-DR7, BF SF) é que, verdadeiramente, representam os fatores determinantes para o desenvolvimento de formas não-típicas e típicas da doença, respectivamente. Tal aspecto corroboraria as diferenças de risco relativo observadas para esses haplótipos.

6.3 A PROTEÍNA BF NA PATOGENIA E SUSCEPTIBILIDADE À DC

Todos os aspectos anteriormente mencionados sugerem participação das variantes de BF na susceptibilidade à DC, corroborando as colocações de SOLLID (2001) de que produtos de outros genes, além de DQ2 e DQ8, podem participar, efetivamente, nas vias que levam à formação da lesão celíaca.

A participação da via alternativa na patogenia da DC é um fato concreto. Os relatos de MASSEY, CAPNER e MOWBRAY (1977) e de UNSWORTH et al. (1993) de que o glúten ativa a via alternativa evidenciam que a enteropatia por sensibilidade ao glúten tem a participação do complemento já na sua fase mais precoce, independente de prévia produção de anticorpos e formação de complexos imunes.

Os estudos de UNSWORTH et al. (1993) demonstraram de forma mais clara o papel da via alternativa do complemento e, conseqüentemente, da proteína BF na patogenia da DC. Em estudos preliminares, os autores já haviam demonstrado que as proteínas do trigo ligam-se, seletivamente, à reticulina em material de biópsia humana (UNSWORTH et al., 1981). Com a demonstração que o glúten ativa a via alternativa, os

autores propõem que os peptídeos do glúten, uma vez ligados à reticulina intestinal, ativam a via alternativa, induzindo dano local, independente de se complexar previamente à IgA, como suposto por MASSEY, CARPNER e MOWBRAY (1977). A ativação das células T ocorreria na sequência, a partir da apresentação de peptídeos de gliadina modificados por ação da enzima transglutaminase, com conseqüente produção de citocinas, induzindo uma resposta celular do tipo Th-1 ou Th-2 (SCHUPPAN; DIETERICH; RIECKEN, 1998). A hipótese de UNSWORTH et al. (1993) pode explicar a ocorrência de DC em pacientes com hipogamaglobulinemia (WEBSTER et al., 1981) e com deficiência de IgA (LAVO et al., 1991).

Níveis séricos diminuídos de C3 em pacientes celíacos não tratados (BOOTH; PETERS; DOE, 1977; TEISBERG et al., 1977; MANNION et al., 1993) são compatíveis com o seu consumo devido a ativação da via alternativa pelo glúten ligado à reticulina, com conseqüente clivagem em C3a e C3b e formação da C3 convertase da via alternativa, C3bBb, estabilizada pela properdina (fator P). Este complexo, C3bBbP, tanto pode clivar novas moléculas de C3, amplificando o processo na mucosa, quanto pode ligar-se a outras moléculas de C3b, gerando C3bBb3b, que constitui a C5 convertase da via alternativa. Com a ativação e clivagem de C5 em C5a e C5b, tem-se, além da importante liberação da anafilatoxina C5a no meio, promovendo a inflamação, o início da via efetora final do complemento, com formação do complexo C5b-9 e conseqüente indução da lesão celular da mucosa.

Com base nessas considerações, os dados do presente estudo permitem sugerir que, aliado à confirmada participação da via alternativa na patogênese da DC, há uma possível influência do polimorfismo de BF na susceptibilidade à doença. A tendência ao aumento de BF SF nos pacientes ($p=0,065$) e o aumento significativo de BF S nos familiares ($p=0,026$) sugerem um papel dessas variantes na susceptibilidade à DC, com a heterozigose como fator predisponente à mesma. Uma maior ou menor afinidade de ligação das diferentes variantes de BF ao C3b, gerado por ação do glúten sobre C3, poderia ter efeitos diferentes sobre a formação da C3 convertase da via alternativa e

conseqüente lesão celular de mucosa. Os resultados aqui obtidos sugerem que uma maior afinidade de BF SF à C3b nos pacientes celíacos está relacionada à maior susceptibilidade à doença que esses apresentam, enquanto uma menor afinidade entre BF S e C3b poderia conferir proteção no desenvolvimento ou na forma de expressão da doença entre os familiares. Corroboram esse aspecto os dados obtidos com os "familiares EmA+", que mostraram discretas alterações sorológicas, clínicas e/ou histológicas, concomitantes à um predomínio de BF S em relação aos pacientes (65,2% vs 55,3%).

A redução dos níveis séricos de BF em pacientes celíacos não tratados (MANNION et al., 1993) ou reexpostos ao glúten (BOSCH et al., 1980), assim como a presença de produtos de ativação de C3 e BF (CEFALO et al., 1989; TEISBERG et al., 1977), são compatíveis com as observações anteriores. Os achados de depósitos subepiteliais de MAC em pacientes celíacos recém diagnosticados ou em reteste com glúten, por HALSTENSEN et al. (1992), confirmam a ativação do complemento e sua participação na formação da lesão celíaca. Segundo os autores, a hiperplasia das criptas, característica da doença, pode, inclusive, ser compensatória ao dano mediado por complemento, e não apenas resultante da ativação de células T. Cabe ainda salientar um possível envolvimento da via das lectinas, através da ativação por MBL, na formação da lesão da mucosa entérica na DC, embora os relatos ainda sejam escassos (BONIOTTO et al., 2002).

A liberação de peptídeos pró-inflamatórios como C3a e C5a pode explicar o rápido aumento da permeabilidade da mucosa intestinal e o intenso afluxo de células inflamatórias na lâmina própria (ELLIOT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998), além de ressaltar as implicações das anafilatoxinas na DC, promovendo e exarcebando a condição patológica. Portanto, a ativação da via alternativa poderia explicar a rápida resposta clínica e histológica observada poucas horas após a reintrodução do glúten (reteste) em pacientes celíacos tratados (BOOTH et al., 1977; UNSWORTH et al., 1993; MARSH et al., 1995; KOTZE, 2001a). É possível que o polimorfismo de BF possa estar relacionado à resposta individual frente ao estímulo do glúten na mucosa entérica.

Os estudos de KIRSCHFINK (1997) enfatizam o papel do complemento na inflamação e destruição tecidual e fornecem uma visão atual do que está se fazendo, através da imunoterapia, para frear a resposta inflamatória mediada por complemento.

COLTEN e GARNIER (1998) reforçam o papel da via alternativa e de BF na patogenia da DC ao enfatizarem que as citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ induzem a um aumento de produção de BF. Esse fato vem de encontro às observações de FERGUSON et al. (1998) de que o dano gerado pela ativação do complemento coexiste com a resposta celular em pacientes celíacos não tratados. As citocinas que promovem uma resposta celular do tipo Th-1, além de exercerem um papel central no processo de atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas, ao estimularem a liberação de metaloproteinases por fibroblastos, estarão favorecendo mais ainda a ativação da via alternativa do complemento, pela indução da maior produção de BF (figura 6).

A produção de anticorpos antigliadina e antitransglutaminase, decorrentes da resposta tipo Th-2, vai favorecer a formação de complexos imunes e a ativação da via clássica do complemento, através dos complexos contendo IgM e IgG (HALSTENSEN et al., 1992), amplificando o processo inflamatório na mucosa intestinal dos pacientes celíacos.

GALLAGHER et al. (1989) detectaram depósitos de MAC apenas nas glândulas de Brünner, localizadas na submucosa do duodeno. Essas secretam muco, bicarbonato e fator de crescimento epidermal (EGF), importantes na defesa e nos processos de reparação da mucosa.

A caracterização que a transglutaminase tecidual (tTG) é encontrada em todas as camadas da parede do intestino delgado, com intensa expressão na submucosa (MOLBERG; Mc ADAM; SOLLID, 2000), veio de encontro aos dados de GALLAGHER et al. (1989). De acordo com SCHUPPAN, DIETERICH e RIECKEN (1998), a tTG e a plasmina são necessárias para a ativação do fator de transformação do crescimento β (TGF- β), requerido para a diferenciação do epitélio intestinal. Segundo os

autores, um excesso de anticorpos sintetizados contra a tTG explicariam a falta de diferenciação das vilosidades epiteliais, resultando na mucosa lisa, característica da DC. Além dos anticorpos EmA-IgA ou anti-tTG-IgA bloqueando a tTG, há fortes evidências que os anticorpos IgG complexados à tTG levem à ativação do complemento, pela via clássica, conforme demonstrado pelos depósitos de MAC nas glândulas de Brünner, na submucosa (GALLAGHER et al., 1989) e subepiteliais, na mucosa intestinal (HALSTENSEN et al., 1992). A presença dos depósitos de MAC, mesmo nos pacientes tratados ou parcialmente tratados, sugere no contexto amplo da agressão tecidual, envolvendo também a ação das inúmeras células imunes efetoras, uma prolongada exposição de auto-antígenos, com contínua ativação do complemento que, no conjunto, seriam os responsáveis pela perpetuação da lesão, explicando, assim, porque o dano tecidual persiste por semanas ou meses, mesmo após uma dieta estritamente isenta de glúten.

A associação da DC com o alelo nulo C4A*Q0 (RITTNER et al., 1984), a maior frequência do haplótipo HLA-B8, DR3, BF*S, C4A*Q0, C4B*1 (ALPER et al., 1987; MANNION et al., 1993) e os níveis significativamente diminuídos de C4 (MANNION et al., 1993) vêm sugerir, ainda, um prejuízo na remoção dos complexos imunes nos pacientes celíacos não tratados, reforçando o papel do complemento na patogenia da DC (MOHAMMED et al., 1976; LAVO et al., 1991).

6.4 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO EM RELAÇÃO AO SEXO

Embora a DC, de maneira geral, afete mais mulheres do que homens (ELLIOTT, MURRAY, WEINSTOCK, 1998), a proporção entre pacientes de um sexo e outro não atinge diferenças tão elevadas como aquelas observadas em outras doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico e tireoidite de Hashimoto (FIKE, 1997a, 1997b). No presente estudo, a proporção foi de 2,8:1 entre o sexo feminino e masculino. Estudos em

pacientes espanhóis, italianos e franceses, entre outros, mostraram uma variação de 1,3:1 até 2,4:1 (BETUEL et al., 1980; MEARIN et al., 1983; RITTNER et al., 1984; GRECO et al., 1998b; TURSI et al., 2001; LOPEZ-VAZQUEZ et al., 2002). Estudos com pacientes brasileiros, do Estado de São Paulo, mostraram proporções semelhantes aos europeus, de 1,3:1 (FREITAS et al., 2002) a 2:1 (SILVA et al., 2000).

Embora a análise da distribuição dos fenótipos e alelos de BF entre os indivíduos do sexo masculino e feminino nos grupos em estudo não tenha caracterizado diferença significativa entre um sexo e outro (tabela 6), as análises comparando indivíduos do mesmo sexo, dentre os vários grupos, demonstraram algumas diferenças para o sexo feminino, que acompanharam as diferenças observadas nos resultados já previamente discutidos (apêndice 6).

Dentre essas, destaca-se um aumento significativo do fenótipo BF S ($p=0,0048$) e a diminuição de BF SF ($p=0,0041$) e do alelo BF*F ($p=0,0022$) nos familiares do sexo feminino em relação aos controles femininos (gráfico 6; tabela 7). Esses dados corroboram as diferenças já caracterizadas entre os familiares de celíacos e os indivíduos da população normal quanto à expressão do polimorfismo de BF, e que está associada ao sexo feminino. Embora tais dados sugiram a participação dessas variantes na maior tendência das mulheres das famílias de celíacos a desenvolver a doença (BF S: $p=0,0048$) e na proteção às mulheres da população sadia (BF SF: $p=0,0041$), as análises até o momento não permitiram esclarecer totalmente tais associações.

A análise entre pacientes e familiares do sexo feminino também caracterizou uma diminuição significativa do fenótipo BF S nas pacientes ($p=0,023$), embora a tendência à maior frequência de BF SF, observada nas amostras como um todo, independente do sexo, também foi observada para o sexo feminino, porém sem atingir significância estatística. Tais dados sugerem, dentro do núcleo familiar, um papel protetor para BF S nos familiares do sexo feminino, em relação às pacientes ($p=0,023$). Corroboram esses achados considerar que dos 15 "familiares EmA+" com o fenótipo BF S, nove são do sexo feminino e seis masculino, sugerindo proteção não só ao desenvolvimento da doença,

como na sua forma de expressão. Por outro lado, a ausência de significância estatística para BF SF no aspecto do sexo (gráfico 6) sugere o envolvimento de tal fenótipo na tendência à susceptibilidade à doença, independente do sexo do paciente.

Os estudos existentes na literatura, envolvendo o polimorfismo de BF e a DC, não fazem análise ou comentários sobre associações do sexo dos pacientes ou familiares em relação às variantes de BF (MALAVASI et al., 1980) ou haplótipos mais frequentes na DC (ALPER et al., 1987; MANNION et al., 1993). Esse fato não permite uma análise comparativa dos dados do presente estudo com a literatura.

Entretanto, GRECO et al. (1998b) não observaram diferença significativa em relação ao sexo dos pacientes com DC (n=145) ao analisar a distribuição dos genótipos HLA de classe II.

Dessa forma, embora se tenha observado diferenças na expressão do polimorfismo de BF nas mulheres das famílias de celíacos, em relação às da população normal e às pacientes com DC, esta associação relacionada ao sexo feminino poderia representar um risco adicional de susceptibilidade ou proteção à DC.

6.5 POLIMORFISMO DE BF E GRAVIDADE DA DC

De acordo com KING, ROTTER e MOTULSKY, a susceptibilidade genética pode envolver diferentes passos na expressão e na história natural da doença. Vários processos podem ser ativos em um indivíduo ou família. Existem diferentes tipos de susceptibilidade: 1) susceptibilidade à doença propriamente dita: pode ser considerada a mais importante, pois coloca um indivíduo e alguns membros da família em risco aumentado de desenvolver a doença; 2) susceptibilidade a diferenças na história natural da doença: quando além da susceptibilidade à doença, o indivíduo pode ser mais propenso a seguir um curso clínico em particular, em termos de gravidade e complicações; 3) susceptibilidade a diferentes tratamentos: está relacionada às variações de resposta da doença às diferentes formas de terapia.

A heterogeneidade clínica observada na DC, variando desde formas clássicas com má absorção grave até pacientes com formas monossintomáticas, silenciosas ou latentes (HORVATH; MEHTA, 2000), aliada ao amplo espectro de alterações histológicas observadas na mucosa intestinal de pacientes não tratados (MARSH, 1992), são muito sugestivos da participação e influência de diferentes genes, tanto na susceptibilidade como no curso clínico e gravidade da DC (SOLLID, 2000).

Os poucos relatos da literatura, relativos ao polimorfismo de BF na DC, não fazem associações das variantes ou haplótipos mais freqüentes nos pacientes ou familiares com os aspectos de gravidade da doença (MALAVASI et al., 1980; ALPER et al., 1987; MANNION et al., 1993).

Considerando a diversidade dos sintomas clínicos observados na DC, bem como a variabilidade na idade em que esses estão presentes nos diferentes pacientes, dificultando até mesmo a obtenção de tais informações, além da necessidade de longos períodos de seguimento (TURSI et al., 2001), optou-se no presente estudo por realizar a associação com a gravidade da doença baseando-se nos títulos dos anticorpos EmA-IgA e nas alterações da mucosa entérica observados nos pacientes e familiares.

A enteropatia presente na DC é dependente de glúten e diferentes autores têm evidenciado que as alterações histopatológicas do intestino freqüentemente são paralelas às alterações nos títulos do EmA-IgA. KAPUSCINSKA et al. (1987), através da determinação simultânea desses fatores, analisaram a dinâmica de flutuação nos títulos do EmA-IgA na DC, caracterizando uma importante correlação desses com as alterações na histopatologia da mucosa entérica tanto ao diagnóstico do paciente, como durante o tratamento com dieta isenta de glúten e após o reteste. Tais dados levaram os autores a sugerir o uso do EmA-IgA como marcador sorológico para a DC, como um guia indicando o momento apropriado para a realização da biópsia em pacientes em avaliação (ou reteste), assim como na monitorização da aderência à dieta de glúten. Estudos subseqüentes vêm demonstrando resultados similares ao longo do tempo (KORPONAY-SZABO et al., 1997; KOTZE et al., 2003).

É pertinente, porém, ressaltar a existência de exceções. Pela individualidade biológica e genética de cada indivíduo, pode-se ter situações de baixos títulos do EmA-IgA, ou mesmo de reações negativas, associadas a uma biópsia de grau III ou IV (ROSTAMI et al., 1999). Ou ainda, inerente ao local da realização da biópsia, a ocorrência de lesões focais (*patch*) faz com que o sítio da biópsia não demonstre as lesões, podendo-se caracterizar uma biópsia normal em um paciente com altos títulos de EmA-IgA ($\geq 1:80$) (KOTZE et al., 2003). Segundo PICARELLI et al. (1996), essas situações são raras.

Entretanto, é certo que o advento dos testes sorológicos e a correlação desses, em grande parte dos casos, com as alterações histológicas da mucosa intestinal e com a presença de algum tipo de sintoma nos pacientes, passou a representar um importante recurso diagnóstico, principalmente para os pacientes que apresentam formas atípicas da doença e para os indivíduos detectados nos estudos de triagem, que apresentam com frequência formas mais brandas ou latentes da DC (FERGUSON et al., 1998). Nesses casos, raramente seria feito o diagnóstico do paciente, baseado apenas no critério da presença de atrofia das vilosidades. Nessas situações, muitas vezes, as anormalidades da mucosa são mínimas e a única alteração histológica observada é um aumento da densidade dos linfócitos intra-epiteliais (LIE) com receptor $\gamma\delta$, que aliado à presença do EmA-IgA (ou anti tTG-IgA) e de sintomas sugestivos de DC, são indicativos para um tratamento com dieta isenta de glúten (KOTZE et al., 2003). Os estudos de PICARELLI et al. (1996), KAUKINEN et al. (2001) e KOTZE et al. (2003) evidenciam uma efetiva resposta à dieta nessas situações, com melhora clínica dos sintomas, diminuição nos LIE e desaparecimento dos anticorpos na circulação. Os autores enfatizam a importância da combinação de dados histológicos, sorológicos e clínicos para o diagnóstico de DC, ressaltando que a confiança exclusiva apenas na histologia ou apenas na sorologia pode resultar em falha diagnóstica em grande parte dos casos.

No presente estudo, a positividade de 100% para o EmA-IgA nos pacientes recém-diagnosticados e naqueles em dieta contendo glúten, assim como a ausência desses

anticorpos (0%) nos pacientes em dieta isenta de glúten e no grupo controle sadio (gráfico 7 e tabela 8), encontram-se de acordo com os dados da literatura e refletem a alta sensibilidade e especificidade do EmA-IgA na DC (KAPUSCINSKA et al., 1987; FERREIRA et al., 1992; VOLTA et al., 1995; BAGNASCO et al., 1997; BARDELLA et al., 2001).

A triagem do EmA-IgA nos familiares demonstrou 13,3% de positividade (20/150) e, considerando que três familiares eram negativos para o EmA-IgA, por estarem já em dieta isenta de glúten na ocasião do teste sorológico, o total de familiares comprometidos foi de 15,3% (23/150). Os estudos de diferentes autores evidenciam, na triagem de familiares, uma positividade variando de 6% a 18%, nas diferentes populações (MÄKI et al., 1991; CATALDO et al., 1995; VAZQUEZ et al., 1995; KORPONAY-SZABO, et al., 1998; MUSTALAHTI et al., 2002a). Tais estudos são de importância na detecção de formas brandas ou latentes da DC e de múltiplos casos da doença dentro de uma mesma família e têm demonstrado diferente prevalência da doença conforme o grau de parentesco. Esses aspectos têm sido relevantes não apenas nos estudos genéticos, como na instituição de uma dieta isenta de glúten precoce nesses indivíduos, prevenindo as complicações tardias da DC como infertilidade, osteoporose e malignidade (KORPONAY-SZABO et al., 1998; ASKLING et al., 2002; HERVONEN et al., 2002; MUSTALAHTI et al., 2002b).

A variação dos títulos do EmA-IgA, tanto nos pacientes como nos familiares positivos, foi de 1:2,5 até 1:80 (gráfico 8), mostrando-se similar aos dados observados por outros autores (KAPUSCINSKA et al., 1987; VAZQUEZ et al., 1995; PICARELLI et al., 1996). Alguns estudos têm evidenciado títulos de EmA-IgA bem mais elevados, com uma variação de 1:5 à 1:500 (KAUKINEN et al., 2001) e até 1:1000 (MÄKI et al., 1991; SATEGNA-GUIDETTI et al., 1995). É possível que estes aspectos sejam inerentes à metodologia utilizada, tanto relativa ao substrato como ao conjugado fluorescente utilizado, além de outros.

A análise dos títulos do EmA-IgA evidenciou uma associação altamente significativa para a presença dos títulos altos ($\geq 1:10$) nos pacientes e de títulos baixos ($\leq 1:5$) nos familiares ($p=0,0004$; tabela 9), que se mostrou totalmente pertinente com as formas ativas de doença nos pacientes e com as formas mais brandas ou latentes observadas com frequência na triagem de familiares.

Nas amostras em que a coleta de sangue para a determinação do EmA-IgA foi simultânea à realização da biópsia, demonstrou-se uma relação altamente significativa ($r=0,80388$; $p<0,00001$) entre a elevação dos títulos dos anticorpos e o maior comprometimento da mucosa intestinal (gráfico 9). Todos os "familiares EmA+", nos quais foi realizada a biópsia ($n=11$), tiveram o diagnóstico de DC confirmado. Naqueles que apresentaram biópsia grau II, com morfologia normal da mucosa, o aumento dos LIE, a positividade do EmA-IgA (apêndice 3) e a avaliação dos sintomas permitiram estabelecer o diagnóstico, que se confirmou com a melhora clínica observada após a dieta isenta de glúten. Tais dados enfatizam a importância de se associar dados sorológicos, histológicos e clínicos no diagnóstico da DC (PICARELLI et al., 1996; FERGUSON et al., 1998; KAUKINEN et al., 2001; KOTZE et al., 2003). Além disso, os familiares que se recusaram a realizar a biópsia para confirmação do diagnóstico ($n=12$) também mostraram melhora nos sintomas com a retirada do glúten da alimentação.

Com base nos dados anteriores convencionou-se, no presente estudo, avaliar a associação da variabilidade de BF com a gravidade da DC, baseando-se nos títulos do EmA-IgA $\leq 1:5$ e $\geq 1:10$ e no comprometimento da mucosa entérica, agrupando as biópsias em grau II e grau III/IV.

Nenhum fenótipo ou alelo de BF mostrou aumento ou diminuição significativos na sua frequência que permitisse estabelecer associação com a maior gravidade da doença, baseados nos títulos de EmA-IgA $\leq 1:5$ e $\geq 1:10$, tanto nos pacientes como nos familiares (tabela 10).

A análise das biópsias demonstrou que 91,5% (65/71) dos pacientes apresentaram lesão de grau III/IV e 8,45% (6/71) lesão de grau II (tabela 11). Os dados foram obtidos

na ocasião do diagnóstico e evidenciaram um grave comprometimento da mucosa intestinal na maioria destes, em consonância com a grande concordância de títulos altos do EmA-IgA (96,2%) para aquelas determinações realizadas simultaneamente à biópsia. A porcentagem de pacientes com biópsias grau II ao diagnóstico (8,45%) é compatível com os dados da literatura e reflete situações em que apenas o aumento dos LIE, a clínica compatível com DC e a sorologia vão levar a um diagnóstico da doença. Nesses pacientes, a concordância com títulos do EmA-IgA $\leq 1:5$ foi de 83,3% para aqueles em que a coleta de sangue foi simultânea à biópsia. Entre os “familiares EmA+”, 54,5% apresentaram lesão de grau II e 45,5% lesão de grau III/IV. Foi altamente significativa a associação do grau III/IV nos pacientes e do grau II nos familiares ($p=0,0009$; tabela 11). Os resultados de análises das biópsias e de EmA-IgA obtidos nos familiares são compatíveis àqueles descritos por MÄKI et al. (1991) e por VAZQUEZ et al. (1995).

A análise da variabilidade de BF em relação ao grau de lesão da biópsia mostrou não haver diferença significativa na distribuição dos fenótipos e alelos de BF nos pacientes celíacos e nos “familiares EmA+”, em relação às biópsias com lesão de grau II e grau III/IV (tabelas 12 e 13). Portanto, essa análise não permitiu evidenciar qualquer variante de BF que pudesse estar relacionada às lesões menos graves nos familiares (grau II) ou mais graves nos pacientes (grau III/IV).

Em síntese, a análise conjunta dos títulos dos anticorpos EmA-IgA e do grau de lesão das biópsias intestinais não demonstrou associação entre as variantes de BF e a gravidade da DC nos pacientes celíacos e familiares da amostra estudada, embora seja certa a participação da via alternativa do complemento e da proteína BF na patogenia da DC, e os resultados do presente estudo sugeriram sua participação na susceptibilidade à doença. Tal dado se insere no contexto de uma doença complexa como a DC em que, possivelmente, a somatória de efeitos de múltiplos genes, e a influência de uns sobre os outros (epistasia), estejam diretamente envolvidas no desenvolvimento e curso clínico da doença e na resposta individual ao tratamento.

A falta de abordagens relativas à gravidade da doença nos outros relatos da literatura envolvendo o polimorfismo de BF e a DC (MALAVASI et al., 1980; ALPER et al., 1987; MANNION et al., 1993) não permitiu a realização de uma análise comparativa com os resultados do presente estudo.

Na maioria dos relatos de associação de BF com outras doenças, as análises refletem, principalmente, os aspectos de susceptibilidade em diferentes populações e não de gravidade. Algumas exceções são observadas, como por exemplo, nos estudos de DEMOUZON et al. (1979), ALLANNIC et al. (1985) e BRAI, ACCARDO e BELLAVIA (1994), com diabetes mellitus insulino-dependente, em que os autores mostram algumas associações relacionadas à idade de início da doença. Na artrite reumatóide, os trabalhos de LANCHBURY, PAL e PAPIHA (1987) sugeriram uma associação de BF S com a gravidade da doença, ao demonstrarem um aumento significativo de BF S nos pacientes com fator reumatóide positivo e fator antinuclear negativo. WATZKO e MESSIAS (1994), por outro lado, em um estudo com pacientes brasileiros com artrite reumatóide, caracterizaram uma associação negativa de BF SF com as classes funcionais III e IV da doença, sugerindo um papel protetor desse alótipo para o desenvolvimento de formas mais incapacitantes da mesma. De forma similar, SILVA (1997), analisando pacientes do sul do Brasil com lúpus eritematoso sistêmico, demonstrou diminuição de BF S nos doentes com serosite, sugerindo um possível papel protetor desse fenótipo no desenvolvimento dessa manifestação em pacientes com lúpus.

NEMETH et al. (1995) demonstraram associação de BF F e C4A*Q0 em pacientes com doença de Alzheimer de início tardio e sugerem envolvimento ativo do complemento na patogenia da doença. RAMBAUSEK et al. (1987) observaram aumento significativo de BF F e C3 F em pacientes com nefropatia por IgA, associado a um maior risco de falência renal e hipertensão.

Associações do polimorfismo de outros componentes do complemento e a gravidade de doenças têm sido descritas. DOHERTY et al. (1994) demonstraram associação de C4A*Q0 com o aumento da mortalidade e com tendência a recaídas em

pacientes com hepatite autoimune, embora não observassem correlação com a idade de início da doença, como caracterizado por SCULLY et al. (1993). PEROUTKA, PRICE e JONES (1997) verificaram significativa incidência de osteoartrite e hipertensão em indivíduos com enxaqueca e C3 F positivos, embora tal alelo não mostrasse associação com a susceptibilidade à doença. LIPSKER et al. (2000) caracterizaram associação de fotossensibilidade e da presença do anticorpo anti-Ro na maioria dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e deficiência simultânea de C2 (C2*Q0). FRANCIOTTA et al. (1995), em um estudo com 80 pacientes italianos com esclerose múltipla, detectaram associação de C4A*Q0 com a forma de exacerbação-remissão da doença.

Em relação aos antígenos HLA de classe II, a literatura mostra dados controversos na associação com a gravidade da DC. GRECO et al. (1998b) determinaram a genotipagem dos *loci* DR e DQ em 145 pacientes franceses com DC, não evidenciando associação com a idade de início dos sintomas e de início da dieta isenta de glúten, nem com os sintomas clínicos e o crescimento dos pacientes. LOPEZ-VAZQUEZ et al. (2002), por outro lado, em estudo com 133 pacientes espanhóis, observaram que o haplótipo DR7/DQ2 conferiu maior risco no desenvolvimento de formas típicas e o haplótipo HLA-B8, DR3, DQ2 de formas atípicas da DC.

6.6 PRESENÇA DE AUTO-ANTICORPOS E POLIMORFISMO DE BF NA DC

A coexistência da DC com diversas outras doenças autoimunes, tais como diabetes mellitus insulino-dependente, doenças da tireóide, doença de Addison, cirrose biliar primária, lúpus eritematoso sistêmico e hepatite crônica autoimune, entre outras, tem sido descrita na literatura e representado um importante alvo de investigações clínicas e laboratoriais (VITORIA et al., 1998; SORENSEN et al., 1999; TOSCANO et al., 2000; COLLIN et al., 2002).

As evidências de que a exposição prolongada ao glúten pode contribuir para o desenvolvimento de outras doenças autoimunes em pacientes celíacos (VENTURA;

MAGAZZU; GRECO, 1999) e de que o diagnóstico precoce de DC e a instituição de uma dieta isenta de glúten em doenças de caráter endócrino, como as tireoidites ou diabetes, é efetiva na eliminação de sintomas e prevenção de complicações (CUOCO et al., 1999; BERTI et al., 2000), têm levado a inúmeros programas de triagem de auto-anticorpos, visando detectar a concomitância dessas enfermidades.

De acordo com SCHUPPAN (2000), mesmo nas formas silenciosas da DC, não tratadas, há maior predisposição de outras doenças autoimunes. Esse aspecto ressalta a importância da pesquisa de auto-anticorpos também nos familiares de celiacos.

Diferentes autores têm sugerido a existência de fatores genéticos comuns, em especial as moléculas da região HLA, como provável causa da associação entre essas doenças (DETLEF, 2000; KAUKINEN et al., 1999; SUMNIK et al., 2000).

O presente estudo apresenta um caráter pioneiro tanto ao realizar um amplo perfil de auto-anticorpos em pacientes com DC e familiares, assim como ao procurar estabelecer uma associação desses com a variabilidade alotípica de BF do sistema complemento.

Como se verifica na tabela 14, quatorze pacientes celiacos (18,42%) e 18 familiares (12%) foram positivos para, pelo menos, um dos auto-anticorpos testados, caracterizando uma diferença significativa nos pacientes em relação aos controles ($p=0,012$). Cinco pacientes e dois familiares apresentaram mais de um auto-anticorpo simultaneamente. VOLTA et al. (1997) obtiveram 26% de positividade para auto-anticorpos, em um estudo com 70 pacientes celiacos italianos, sendo 21% para os anticorpos antitireoideanos, 11% para anticélulas gástricas parietais e 3% para anticélulas das ilhotas pancreáticas.

Ao avaliar o perfil de positividade dos auto-anticorpos obtido neste estudo, observou-se que apenas os anticorpos antinucleares (ANA) mostraram aumento significativo nos pacientes, em relação aos controles sadios ($p=0,0064$). Embora os anticorpos antimicrosossomais tireoideanos (AAM) tenham mostrado as maiores porcentagens, tanto para os pacientes como para os familiares (10,52% e 6,66%

respectivamente), não atingiram significância estatística em comparação com os controles (4,12%). A literatura tem evidenciado que, dentre as doenças endócrinas, as doenças autoimunes da tireóide apresentam uma das mais importantes associações com a DC, com uma prevalência de 13 a 20%, variando entre formas clínicas e subclínicas nas diferentes populações estudadas (SATEGNA-GUIDETTI et al., 1998, 2001; HAKANEN et al., 2001). É possível que a prevalência obtida para os AAM no presente estudo, mostrando-se abaixo dos relatos de outros autores, esteja relacionada à própria seleção dos pacientes com DC, sem características de envolvimento com outras doenças autoimunes. A avaliação clínica dos pacientes positivos para os AAM (8/76) sugeriu formas subclínicas da doença, que requerem um seguimento criterioso, considerando que esses pacientes, quando em uso de glúten, podem evoluir mostrando algum grau de disfunção da tireóide ao longo do tempo (SATEGNA-GUIDETTI, 2001).

Dentre os familiares positivos para os AAM (10/150), três fazem parte do grupo de "familiares EmA+", recomendando-se para esses o mesmo critério de seguimento dos pacientes (apêndice 3).

Embora os ANA tenham se mostrado significativamente aumentados nos pacientes celíacos em relação aos controles ($p=0,0064$), com títulos variando entre 1:20 e 1:80, até o momento nenhum paciente mostrou sinais clínicos de doenças reumáticas sistêmicas, como lúpus eritematoso sistêmico (LES). Dentre os cinco familiares positivos (5/150; $p=0,080$), um faz parte do grupo de "familiares EmA+". Todos os pacientes e familiares positivos para os ANA demonstraram reação negativa para os anticorpos anti-dsDNA. A coexistência de LES e DC é rara e os estudos descritos na literatura freqüentemente são restritos a descrição de casos isolados (VARKEL et al., 1989; MUKAMEL et al., 1994; KOMATIREDDY et al., 1995). LERNER et al. (1998) detectaram, pelo método de ELISA, 23% de positividade para o anticorpo anti-dsDNA em um grupo de 35 pacientes celíacos, cujos níveis foram significativamente superiores aos controles sadios, porém baixos em relação aos pacientes com LES. Os autores não evidenciaram correlação

clínica com LES e ressaltam a importância do seguimento dos pacientes, considerando a precocidade no aparecimento de alguns auto-anticorpos em diversas doenças autoimunes.

Embora seja bem caracterizada a associação entre DC e diabetes mellitus insulino-dependente (DMID) e sejam freqüentes os estudos de triagem nessas doenças (VOLTA et al., 1997; VITORIA et al., 1998), optou-se pela não realização dessa avaliação neste estudo, pelo predomínio de indivíduos adultos na amostragem, assim como pelo seu alto custo. Os estudos de VITORIA et al. (1998) e SUMNIK et al. (2000) mostraram uma prevalência de 6,45% e 4,1%, respectivamente, para DC em crianças com DMID, dando ênfase à necessidade de programas regulares de triagem de DC nessas crianças. Tal procedimento não é considerado, até a data atual, necessário nos familiares de primeiro grau de pacientes diabéticos, considerando que a prevalência de DC nesses é similar aos indivíduos da população normal (JAEGER et al., 2001; SAUKKONEN et al., 2001).

Por outro lado, a baixa prevalência de DMID em crianças com DC (VITORIA et al., 1998) leva a questionamentos sobre a necessidade de protocolos de rotina para pesquisa dos anticorpos anticélulas das ilhotas em DC. Os autores sugerem um mecanismo hipotético protetor contra DMID nas crianças com DC, decorrente da dieta isenta de glúten. Tal hipótese é coerente com os estudos ressaltando a importância da presença do glúten (TOSCANO et al., 2000) e do tempo de exposição ao mesmo (VENTURA et al., 1999) na indução de outras doenças autoimunes, em especial as endócrinas, nos pacientes com DC.

A positividade para os anticorpos anti-CGP nos pacientes (2,63%) e familiares (2,0%), embora com títulos relativamente elevados (1:80), foi inferior a de 11% descrita por VOLTA et al. (1997). A concomitância de DC e anemia perniciosa e/ou gastrite atrófica é rara (SHEEHAN; STANTON-KING, 1993) e, no presente estudo, os dados laboratoriais e clínicos não confirmaram tal diagnóstico, sendo conveniente o seguimento desses pacientes e familiares positivos.

Os pacientes (3,95%) e familiares (1,33%) positivos para AML não apresentaram manifestação clínica de hepatite autoimune. Nenhum deles foi positivo simultaneamente

para os ANA, como se observa com frequência na hepatite autoimune do tipo 1. Estudos recentes têm ressaltado a importância da triagem de DC nessa enfermidade, pela prevalência acima da esperada (SJOBERG; LINDGREN; ERIKSSON, 1997). VOLTA et al. (1998) detectaram 4% de positividade (8/181) para o EmA-IgA em pacientes com hepatite autoimune, com confirmação histológica do diagnóstico, sendo seis casos de hepatite autoimune do tipo 1 e dois casos do tipo 2. Nos pacientes celíacos e familiares em estudo não foi caracterizado nenhum caso de hepatite autoimune tipo 2, compatível com a ausência de anticorpos anti-LKM (0%; tabela 14).

Embora VOLTA et al. (1998) não observaram a presença de DC em pacientes com cirrose biliar primária (CBP), seguimento de anos em pacientes celíacos dinamarqueses e suecos (SORENSEN et al., 1999), argentinos (NIVELONI et al., 1998) e ingleses (KINGHAM; PARKER, 1998) demonstraram a ocorrência de CBP superior à esperada nesses pacientes. KINGHAM e PARKER (1998), após um acompanhamento de 12 anos, verificaram prevalência de 3% de CBP em pacientes celíacos (n=143) e de 6% de DC em pacientes com CBP (n=67). Os autores enfatizam a importância de triagens sorológicas de rotina nessas doenças, através da pesquisa dos anticorpos antimitocôndria e antiendomísio, respectivamente. A ausência de anticorpos antimitocondriais nas amostras analisadas é coerente com a ausência de CBP nos pacientes e familiares em estudo.

Os resultados do presente estudo, aliados aos inúmeros relatos da literatura citados, reforçam as características autoimunes da DC. A simultaneidade de outros diferentes auto-anticorpos, tanto nos pacientes celíacos como nos familiares, deixa clara a necessidade de um criterioso e prolongado seguimento desses indivíduos para esclarecer o significado clínico desses achados.

A análise de associação entre a presença dos vários auto-anticorpos investigados e a variabilidade de BF não demonstrou diferenças significativas que permitissem atribuir a qualquer das variantes características de susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento de auto-anticorpos nos pacientes celíacos (tabela 15) ou nos familiares (tabela 19).

A significativa positividade dos ANA nos pacientes ($p=0,0064$) não mostrou associação com as variantes de BF, ao se comparar os pacientes positivos com aqueles negativos para esse auto-anticorpo (tabela 17).

Por outro lado, a distribuição dos fenótipos e alelos de BF nos pacientes com e sem auto-anticorpos, quando comparados ao grupo controle (tabela 16), mostrou uma frequência significativamente menor do alelo BF*F nos pacientes com auto-anticorpos ($p=0,044$), sugerindo um possível papel protetor deste alelo no desenvolvimento de outros auto-anticorpos em pacientes celíacos. Essa característica se manteve ao realizar-se uma análise similar para os ANA (tabela 18), sugerindo maior resistência nos indivíduos portadores do alelo BF*F a desenvolver esse auto-anticorpo. Se considerar que o alelo BF*F faz parte de um dos haplótipos estendidos mais frequentes na DC (HLA-B44, DR7, FC31), estudos mais detalhados poderiam demonstrar se tal achado tem alguma relação com o baixo índice de associação da DC com LES ou outras doenças do colágeno.

Não foram encontrados relatos na literatura que permitissem estabelecer comparações com os dados recém abordados. Os estudos envolvendo o polimorfismo de BF e DC não fazem referências à análise de auto-anticorpos nos pacientes celíacos e familiares (MALAVASI et al., 1980; ALPER et al., 1987; MANNION et al., 1993).

Na grande maioria, os estudos de associação de BF com outras doenças não demonstram avaliações relacionadas à presença de auto-anticorpos. Como exceção, pode-se citar os relatos de LANCHBURY, PAL e PAPIHA (1987), em 225 pacientes com artrite reumatóide, determinando associação com a presença do fator reumatóide (FR) e anticorpo antinuclear (ANA). Os autores caracterizaram aumento significativo do fenótipo BFS nos pacientes que eram FR positivos e ANA negativos simultaneamente, em contraste àqueles positivos simultaneamente para FR e ANA ou negativos para ambos. SILVA (1997), em um estudo com 95 pacientes com LES, não evidenciou associação dos fenótipos de BF com a presença do anticorpo anti-dsDNA.

6.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos neste estudo é possível atribuir às variantes alotípicas de BF uma participação na susceptibilidade à DC na população em estudo. Essa associação pode se mostrar importante na definição da população de risco para a doença, considerando as diferenças observadas entre os membros da família de celíacos e os indivíduos sadios da população geral, assim como entre os pacientes e os familiares.

Segundo CLOT e BABRON (2000), a pesquisa de genes responsáveis pelas doenças de caráter multifatorial não é uma tarefa fácil, porém a identificação de genes de susceptibilidade é primordial no desenvolvimento de estratégias de detecção, diagnóstico e prevenção, para melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados.

É possível que FERGUSON et al. (1998), ao questionarem que poucas pesquisas vinham sendo feitas sobre os diferentes fatores que levam a doenças silenciosas em alguns pacientes e má absorção e diarreia em outros, não imaginariam os avanços e a compreensão que seriam atingidos na DC nos últimos anos. Segundo ALDERSLEY et al. (2000), não é fácil compreender como apesar de aproximadamente 95% dos pacientes celíacos apresentarem HLA-DQ2, a maioria das pessoas da população normal com tal haplótipo (20-30%) nunca desenvolverá a doença.

Os estudos nas diferentes populações têm mostrado que embora tal associação seja inquestionável, é a interação de múltiplos genes, possivelmente de efeito moderado, aliado aos fatores ambientais, que vão fazer com que essa doença de diferentes estágios patológicos culmine em diferentes formas de expressão independente da população, faixa etária, sexo ou família.

Rígidos conceitos e critérios pré-estabelecidos precisaram ser revistos e adequados às novas evidências, para que pacientes não deixassem de ser diagnosticados quando o clínico detém-se, basicamente, nos dados histológicos (PICARELLI et al., 1996; KAUKINEN et al., 2001). Estudos mostrando a evolução de pacientes (COLLIN et al., 1993) e familiares (NIVELONI et al., 2000; HOGBERG et al., 2003) com formas latentes

da doença ressaltam a importância da instituição de uma dieta isenta de glúten, mesmo na ausência de atrofia de vilosidades, visando maior qualidade de vida ao indivíduo, além de proporcionar redução na mortalidade, na associação com outras doenças autoimunes e no risco de malignidade, osteoporose e infertilidade (HOLMES et al., 1989; HORVATH; MEHTA, 2000; CORRAO et al., 2001; COLLIN et al., 2002; HOMES, 2002; MUSTALAHTI et al., 2002b).

Pacientes com formas clássicas da DC, de maneira geral, não constituem dificuldade diagnóstica. Com os conhecimentos atuais, entretanto, é possível afirmar que dificilmente se chegará a um marcador único que confirme, para o clínico, se um paciente ou familiar com uma biópsia grau II ou apenas aumento dos linfócitos intra-epiteliais, vai desenvolver DC ou não. Em uma doença de caráter complexo como a DC, o clínico necessita adequar-se às estratégias de detecção que a doença exige para definir um indivíduo ou família de maior risco. É o conjunto de marcadores que vai direcionar o diagnóstico ou prognóstico da doença. Os genes de susceptibilidade/resistência na população certamente vão contribuir nesta estratégia. A história familiar, a presença de DC ou outras doenças autoimunes na família, os antígenos HLA, os outros genes envolvidos na população, os dados histológicos, sorológicos e a clínica do paciente, no conjunto, vão sugerir a instituição ou não de uma dieta isenta de glúten. A regressão dos sintomas e das alterações histológicas e sorológicas vão confirmar o diagnóstico nesses pacientes.

"O indivíduo não tolerante é vulnerável a ser ativamente imunizado ao antígeno alimentar (glúten) se uma combinação particular da dieta, da permeabilidade intestinal e de sinais imunomodulatórios sistêmicos e de mucosa coincidem. A frequência com que isso ocorre no indivíduo susceptível e em que idade dependerá de inúmeros fatores intrínsecos e ambientais" (FERGUSON et al., 1998).

7 CONCLUSÕES

A análise dos dados do presente estudo levaram às seguintes conclusões:

1. A distribuição dos fenótipos e alelos de BF não demonstrou associação significativa entre os pacientes celíacos e os indivíduos sadios da população estudada.
2. O aumento significativo do fenótipo BF S ($p=0,001$) e diminuição de BF SF ($p=0,002$) e do alelo BF*F ($p=0,0003$) nos familiares, em relação aos controles normais, mostram que esses indivíduos diferem quanto à expressão do polimorfismo de BF.
3. A diminuição significativa do fenótipo BF S ($p=0,026$) observada nos pacientes, quando comparados aos respectivos familiares, sugere um caráter protetor dessa variante no desenvolvimento da doença entre familiares de celíacos. A tendência ao aumento de BF SF nos pacientes ($p=0,065$), sugere a heterozigose BF SF como fator predisponente à doença.
4. Os "familiares EmA+" não mostraram diferenças significativas na distribuição das variantes de BF, sugerindo-os como um grupo com características limítrofes entre os pacientes e "familiares EmA-", compatível com as formas silenciosas ou atípicas da doença que alguns desses apresentam.
5. As mulheres das famílias de celíacos diferem na expressão do polimorfismo de BF em relação às mulheres da população normal. O aumento de BF S nos familiares do sexo feminino, em relação às pacientes, sugere um caráter protetor dessa variante no desenvolvimento da DC dentre as familiares de celíacos.

6. A variabilidade de BF não demonstrou associação com a gravidade da DC, analisada através dos títulos dos anticorpos EmA-IgA e do grau de lesão da mucosa entérica, em pacientes celíacos e "familiares EmA+".
7. Os pacientes celíacos mostraram significativa positividade para a presença de outros auto-anticorpos (18,42%; $p=0,012$), especificamente ANA (7,9%; $p=0,0064$), em relação ao grupo controle. A presença de auto-anticorpos circulantes nos pacientes celíacos e familiares não mostrou associação com as variantes de BF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARDEN, L. A.; DE GROOT, E. R.; FELTKAMP, T. E. Immunology of DNA III. Crithidia lucilliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 254, n. 30, p. 505-515, 1975.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. The complement system. In: _____. **Cellular and molecular immunology**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1997. p. 313-338.

ALDERSLEY, M. A. et al. No polymorphism in the tissue transglutaminase gene detected in coeliac disease patients. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 35, n. 1, p. 61-63, 2000.

ALLANNIC, H. et al. Factor B (Bf) and glyoxalase genes in insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabete et Metabolisme**, Paris, v. 11, n. 1, p. 22-26, 1985.

ALPER, C. A.; PROPP, R. P. Genetic of polymorphism of the third component of human complement (C3). **Journal of Clinical Investigation**, New Jersey, v. 47, n. 9, p. 2181-2191, 1968.

ALPER, C. A.; BOENICH, T.; WATSON, L. Genetic polymorphism in human glycine-rich-beta-glicoprotein. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 135, n. 1, p. 68-80, 1972.

ALPER, C. A. et al. Statement on the polymorphism of the third component of complement in man (C3). **Vox Sanguinis**, Basel, v. 27, n. 1, p.18-20, 1973.

ALPER, C. A. Inherited strutral polymorphism in human C2: evidence for genetic linkage between C2 and BF. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 144, n. 4, p. 1111-1115, 1976.

ALPER, C. A. et al. Extended major histocompatibility complex haplotypes in patients with gluten-sensitive enteropathy. **The Journal of Clinical Investigation**, New Jersey, v. 79, n. 1, p. 251-256, 1987.

AMENO, S.; NANIKAWA, R. Genetic polymorphism of factor B (Bf) in Okayama Prefecture, Japan. **Acta Medica Okayama**, Okayama, v. 38, n. 4, p. 321-324, 1984.

ASKLING, J. et al. Câncer incidence in a population-based cohort of individuals hospitalized with celiac disease or dermatitis herpetiformis. **Gastroenterology**, New York, v. 123, n. 5, p. 1428-1435, 2002.

BAGNASCO, M. et al. IgA antiendomysium antibodies in human umbilical cord sections as a screening test in relatives of patients with celiac disease. **Allergy**, Copenhagen, v. 52, n. 10, p. 1017-1021, 1997.

BAHIA, M. et al. Serum antigliadin antibody levels as a screening criterion before jejunal biopsy indication for celiac disease in a developing country. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 34, n. 11, p. 1415-1420, 2001.

BARBA, G.; RITTNER, C.; SCHNEIDER, P. M. Genetics of human complement C4A deficiency: detection of a point mutation leading to nonexpression. **The Journal of Clinical Investigation**, New Jersey, v. 91, n. 4, p. 1681-1686, 1993.

BARBIERI, D. et al. A biopsia peroral do intestino delgado na criança. III- Resultados globais. Classificação dos padrões histológicos. Correlação estereo-histológicas. Síndrome pós-biopsia. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, 141-149, 1970.

BARDELLA, M. T. et al. Serological markers for coeliac disease: is it time to change? **Digestive and Liver Disease**, Roma, v. 33, n. 5, p. 426-431, 2001.

BERTI I. et al. Usefulness of screening program for celiac disease in autoimmune thyroiditis. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 45, n. 2, p. 403-406, 2000.

BERTRAMS, J. et al. Association of rare genes products of the C2, C4, Bf gene cluster with type I diabetes. **Immunobiology**, Oxford, v. 157, n. 1, p. 203, 1980.

BERTRAMS, J. et al. Normal distribution of factor B (Bf) allotypes in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 137-140, 1981.

BETUEL, H. et al. Adult celiac disease associated with HLA-DRw3 and DRw7. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 231-238, 1980.

BEVAN, S. et al. Contribution of the MHC region to the familial risk of coeliac disease. **Journal of Medical Genetics**, London, v. 36, n. 9, p. 687-690, 1999.

BIGAZZI, P. E.; ROSE, N. R. Pruebas para anticuerpos contra antígenos tissulares específicos. In: ROSE, N. R.; FRIEDMAN, H. **El laboratorio en inmunología clínica**. 2. ed. Buenos Aires: Editorial Medica Pan Americana, 1984. p. 968-979.

BING, D. H.; ALPER, C. A. Complement in health and disease. In: COLVIN, R. B.; BHAN, A. K.; McCLUSKEY, R. T. **Diagnostic Immunopathology**. 2. ed. New York: Raven Press, 1995. p. 85-94.

BONIOTTO, M. et al. Variant mannose-binding lectin alleles are associated with celiac disease. **Immunogenetics**, New York, v. 54, n. 8, p. 596-598, 2002.

BOOTH, C. C.; PETERS, T. J.; DOE, W. F. Immunopathology of coeliac disease. **Symposium Ciba Foundation**, Amsterdam, v. 26-28, n. 46, p. 329-346, 1977.

BOSCH, C. et al. Complement studies in children with treated coeliac disease after gluten challenge. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 134, n. 2, p. 145-148, 1980.

BOUDRAA, G. et al. Prevalence of coeliac disease in diabetic children and their first-degree relatives in west Algeria: screening with serological markers. **Acta Paediatrica Supplement**, Oslo, v. 412, n. 2, p. 58-60, 1996.

BRAI, M.; ACCARDO, P.; BELLAVIA, D. Polymorphism of the complement components in human pathology. **Annali Italiani di Medicina Interna**, Roma, v. 9, n. 3, p. 167-172, 1994.

BRINCH, L. et al. The metabolism of C3 in adult coeliac disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 15, n. 1, p. 33-38, 1980.

BUGAWAN, T. L. et al. A combination of a particular HLA-DP beta allele and an HLA-DQ heterodimer confers susceptibility to coeliac disease. **Nature**, London, v. 339, n. 6224, p. 470-473, 1989.

BÜRGIN-WOLFF, A. et al. Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease. **Archives of Disease in Childhood**, London, v. 66, n. 8, p. 941-947, 1991.

CATALDO, F. et al. Antiendomysium antibodies and coeliac disease: solved and unsolved questions. An Italian multicentre study. **Acta Paediatrica**, Oslo, v. 84, n. 10, p. 1125-1131, 1995.

CATALDO, F. et al. Celiac disease and selective immunoglobulin A deficiency. **Journal of Pediatrics**, St Louis, v. 131, n. 2, p. 306-308, 1997.

CATASSI, C. et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. **The Lancet**, London, v. 343, n. 8891, p. 200-203, 1994.

CEFALO, A. et al. Paediatric coeliac disease and dermatitis herpetiformis: differences in complement activation in relation to diet. **Bolletino dell'Istituto Sieroterapico Milanese**, Milano, v. 68, n.1, p. 72-81, 1989.

CHALLACOMBE, D. N. Screening tests for Celiac Disease. **Archives of Disease in Childhood**, London, v. 73, n.1, p. 3-7, 1995.

CHORZELSKI, T. P. et al. IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and celiac disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 420, p. 325-334, 1983.

CLOT, F. et al. HLA-DR53 molecules are associated with susceptibility to celiac disease and selectively bind gliadin-derived peptides. **Immunogenetics**, New York, v. 49, n. 9, p. 800-807, 1999(a).

CLOT, F. et al. Linkage and association study of the CTLA-4 region in coeliac disease for Italian and Tunisian populations. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 54, n. 5, p. 527-530, 1999(b).

CLOT, F.; BABRON, M. C. Genetics of celiac disease. **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v. 71, n. 1-2, p. 76-80, 2000.

COLLIN, P. et al. Follow-up of patients positive in reticulin and gliadin antibody tests with normal small-bowel biopsy findings. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 28, n. 7, p. 595-598, 1993.

COLLIN, P.; KAUKINEN, K.; MÄKI, M. Clinical features of celiac disease today. **Digestive Disease and Science**, New York, v. 17, n. 2, p. 100-106, 1999.

COLLIN, P. et al. Endocrinological disorders and celiac disease. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 23, n. 4, p. 464-483, 2002.

COLONNA, M. et al. Reassessment of HLA association with celiac disease in special reference to the DP association. **Human Immunology**, New York, v. 29, n. 4, p. 263-274, 1990.

COLONNA, M. et al. Allelic variants of the human putative peptide transporter involved in antigen processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 89, n. 9, p. 3932-3936, 1992.

COLTEN, H. R.; GARNIER, G. Regulation of complement protein gene expression. In: VOLANAKIS, J. E.; FRANK, M. M. **The human complement system in health and disease**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 217-240.

CONGIA, M. et al. A high frequency of the A30, B18, DR3, DRw52, DQw2 extended haplotype in Sardinian celiac disease patients: Further evidence that disease susceptibility

is conferred by A1*0501, B1*0201. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 39, n. 2, p. 78-83, 1992.

CORRAO, G. et al. Mortality in patients with celiac disease and their relatives: a cohort study. **The Lancet**, London, v. 358, n. 9279, p. 356-361, 2001.

CRAWFORD, K.; ALPER, C. A. Genetics of the complement system. **Reviews in Immunogenetics**, Copenhagen, v. 2, n. 3, p. 323-338, 2000.

CUOCO, L. et al. Prevalence and early diagnosis of coeliac disease in autoimmune thyroid disorders. **Italian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Padova, v. 31, n. 4, p. 283-287, 1999.

DAUSSET, J. et al. A haplotype study of HLA complex with special reference to the HLA-DR series and to Bf. C2 and glyoxalase I polymorphisms. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 12, n. 4, p. 297-307, 1978.

DE LA CONCHA, E. G. et al. Celiac disease and TNF promoter polymorphisms. **Human Immunology**, New York, v. 61, n. 5, p. 513-517, 2000.

DE MOUZON, A. et al. BF and C4 markers for insulin-dependent diabetes in basques. **The Lancet**, London, v. 2, n. 8156-8157, p. 1364, 1979.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. Complement, post-C3 (lytic) pathway. In: ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Encyclopedia of Immunology**. 2. ed. London: Academic Press, 1992. p. 385-387.

DETLEF, S. Special concepts of celiac disease pathogenesis. **Gastroenterology**, New York, v. 119, n. 1 p. 234-242, 2000.

DIETERICH, W. et al. Identification of the tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. **Nature Medicine**, New York, v. 3, n. 7, p. 797-801, 1997.

DIETERICH, W.; LAAG, E.; SCHOPPER, H. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. **Gastroenterology**, New York, v. 115, n. 6, p. 1317-1321, 1998.

DJILALI-SAIAH, I. et al. Polymorphism of antigen processing (TAP, LMP) and HLA class II genes in celiac disease. **Human Immunology**, New York, v. 40, n. 1, p. 8-16, 1994.

DOHERTY, D. G. et al. Polymorphism in the human complement C4 genes and genetic susceptibility to autoimmune hepatitis. **Autoimmunity**, New York, v. 18, n.4, p. 243-249, 1994.

DYER, P. A. et al. Properdin factor B alleles in patients with idiopathic membranous nephropathy. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 15, n. 5, p. 505-507, 1980.

EK, J. et al. Strong association between the HLA-Dw3-related B cell alloantigen-DRw3 and coeliac disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 13, n. 2, p. 229-233, 1978.

ELLIOTT, D. E.; MURRAY, J. A.; WEINSTOCK, J. V. Inflammatory bowel and celiac disease. In: ROSE, N. R.; MACKAY, I. R. **The autoimmune diseases**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1998. p. 477-509.

EMBER, J. A.; JAGELS, M. A.; HUGLI, T. E. Characterization of complement anaphylatoxins and their biological responses. In: VOLANAKIS, J. E.; FRANK, M. M. **The Human complement system in health and disease**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 241-284.

FANANAS, L. et al. Complement genetic markers in schizophrenia: C3, BF and C6 polymorphisms. **Human Heredity**, Basel, v. 42, n. 3, p. 162-167, 1992.

FAULKNER-HOGG, K. B.; SELBY, W. S.; LOBLAY, R. H. Dietary analysis in symptomatic patients with coeliac disease on a gluten-free diet: the role of trace amounts of gluten and non-gluten food intolerances. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 34, n. 8, p. 784-789, 1999.

FERGUSON, A.; MURRAY, D. Quantification of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. **Gut**, London, v. 12, n. 12, p. 988- 994, 1971.

FERGUSON, A. New perspectives of the pathogenesis of coeliac disease: evolution of a working clinical definition. **Journal of International Medicine**, Oxford, v. 240, n. 6, p. 315-318, 1996.

FERGUSON, A. et al. Heterogeneity of coeliac disease: clinical, pathological, immunological and genetic. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 895, p. 112-120, 1998.

FERREIRA, M. et al. Endomysial antibody: is the best screening test for coeliac disease? **Gut**, London, v. 33, n. 12, p. 1633-1637, 1992.

FIELDER, A. H. et al. Optic neuritis and multiple sclerosis: do factor B alleles influence progression of disease? **The Lancet**, London, v. 2, n. 8258, p. 1246-1248, 1981.

FIELDER, A. H. et al. Family study of the major histocompatibility complex in patients with Systemic Lupus Erythematosus: importance of null alleles of C4A and C4B in determining disease susceptibility. **British Medical Journal**, London, v. 268, n. 6363, p. 425-428, 1983.

FIKE, D. J. Non organ-specific autoimmune disease. In: SHEEHAN, C. **Clinical Immunology. Principles and Laboratory Diagnosis**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. p. 283-296 (a).

FIKE, D. J. Organ-specific autoimmune disease. In: SHEEHAN, C. **Clinical Immunology. Principles and Laboratory Diagnosis**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. p. 297-304 (b).

FINN, J. E. et al. Molecular analysis of C3 allotypes in patients with systemic vasculitis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Belfast, v. 9, n. 11, p. 1564-1567, 1994.

FRANCIOTTA, D. et al. HLA complement gene polymorphism in multiple sclerosis. A study on 80 Italian patients. **Journal of Neurology**, New York, v. 242, n. 2, p. 64-68, 1995.

FREITAS, I. N. et al. Celiac Disease in Brazilian Adults. **Journal of Clinical Gastroenterology**, New York, v. 34, n. 4, p. 430-434, 2002.

FRONEK, Z. et al. Major histocompatibility complex genes and susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 33, n. 10, p. 1542-1543, 1990.

GALLAGHER, R. B. et al. Complement activation within the coeliac small intestine is localised to Brunner's glands. **Gut**, London, v. 30, n. 11, p. 1568-1573, 1989.

GANDOLFI, R. et al. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. **American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 95, n. 3, p. 689-692, 2000.

GESERICK, G.; PATZELT, D. Factor B (BF) subtyping by isoelectring focusing: methods, nomenclatures, genetics and forensic application. **Electrophoresis**, Deerfield Beach, Germany, v. 9, n. 8, p.418-421, 1988.

GESERICK, G. et al. Factor B (BF) nomenclature statement. **Complement and Inflammation**, Basel, v. 7, n. 4-6, p. 255-260, 1990.

GILLETT, H. R.; FREEMAN, H. J. Comparison of IgA endomysium antibody and IgA tissue transglutaminase antibody in celiac disease. **The Canadian Journal of Gastroenterology**, Oakville, v. 14, n. 8, p. 665-666, 2000.

GLOVSKY, M. M. Applications of complement determinations in human disease. **Annals of Allergy**, Palatine, v. 72, n. 6, p. 477-790, 1994.

GODKIN, A.; JEWELL, D. The pathogenesis of celiac disease. **Gastroenterology**, New York, v. 115, n. 1, p. 206-210, 1998.

GÖTZE, B.; BIANCO, C.; COHN, Z. A. The induction of macrophage spreading by factor B of the properdin system. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 149, n. 2, p. 372-386, 1979.

GRECO, L. et al. Genome search in celiac disease. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 62, n. 3, p. 669-675, 1998 (a).

GRECO, L. et al. Lack of correlation between genotype and phenotype in celiac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 26, n. 3, p. 286-290, 1998 (b).

GREENBERG, D. A.; HODGE, S. E.; ROTTER, J. I. Evidence for recessive and against dominant inheritance at the HLA "linked" locus in celiac disease. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 34, n. 2, p. 263-277, 1982 (a).

GREENBERG, D. A.; LANGE, K. L. A maximum likelihood test of the two locus model for coeliac disease. **American Journal of Medical Genetics**, New York, v. 12, n. 1, p. 75-82, 1982(b).

GRODZINSKY, E. et al. Anti-endomysium and anti-gliadin antibodies as serological markers for coeliac disease in childhood: a clinical study to develop a practical routine. **Acta Paediatrica**, Oslo, v. 84, n. 3, p. 294-298, 1995.

GRUMET, F. C. et al. Histocompatibility (HLA) antigens associated with systemic lupus erythematosus. A possible genetic predisposition to disease. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 285, n. 4, p. 193-196, 1971.

HAKANEN, M. et al. Clinical and subclinical autoimmune thyroid disease in adult celiac disease. **Digestive Disease and Science**, New York, v. 46, n. 12, p. 2631-2635, 2001.

HÄLLSTRÖM, O. Comparison of IgA-class reticulin and endomysium antibodies in celiac disease and dermatitis herpetiformis. **Gut**, London, v. 30, n. 9, p. 1225-1232, 1989.

HALSTENSEN, T. S. et al. Association of subepithelial deposition of activated complement and immunoglobulin G and M response to gluten in coeliac disease. **Gastroenterology**, New York, v. 102, n. 3, p. 751-759, 1992.

HAMURO, J.; HADDING, U.; BITTER-SUERMAN, D. Fragments Ba and Bb derived from guinea pig factor B of the properdin system: purification, characterization and biologic activities. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.120, n. 2, p. 438-444, 1978.

HERVONEN, K. et al. First-degree relatives are frequently affected in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 37, n. 1, p. 51-55, 2002.

HODGES, S. et al. Autoimmune chronic active hepatitis in a family. **Gut**, London, v. 32, n. 3, p. 299-302, 1991.

HOGBERG, L. et al. Familial prevalence of celiac disease: a twenty-year follow-up study. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 38, n. 1, p.61-65, 2003.

HOLMES, G. K. T. et al. Malignancy in celiac disease - effect of a gluten free diet. **Gut**, London, v. 30, n. 3, p. 333-338, 1989.

HOLMES, G. K. Coeliac disease and malignancy. **Digestive and liver disease**, Roma, v. 34, n. 3, p.229-237, 2002.

HONG, G. H. et al. Association of complement C4 and HLA-DR alleles with systemic lupus erythematosus in Koreans. **Journal of Rheumatology**, Toronto, v. 21, n. 3, p. 442-447, 1994.

HORVATH, K.; MEHTA, D. I. Celiac disease. A worldwide problem. **Indian Journal of Pediatrics**, New Delhi, v. 67, n. 10, p. 757-763, 2000.

HOULSTON, R. S.; FORD, D. Genetics of celiac disease. **The Quartely Journal of Medicine**, Oxford, v. 89, n. 10, p. 737-743, 1996.

HOULSTON, R. S. et al. Linkage analysis of candidate regions for celiac disease genes. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 1335-1339, 1997.

IKEDA K. et al. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 262, n. 16, p. 7451-7454, 1987.

JAEGER, C. et al. Comparative analysis of organ-specific autoantibodies and celiac disease-associated antibodies in type I diabetic patients, their first-degree relatives, and healthy control subjects. **Diabetes Care**, New York, v. 24, n. 1, p. 27-32, 2001.

JAMES K. Mechanisms of the nonspecific immune response. In: SHEEHAN, C. **Clinical Immunology. Principles and laboratory diagnosis**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. p. 33-53.

KAGNOFF, M. F. et al. Structural analysis of the HLA-DR, -DQ, and -DP alleles on the celiac disease-associated HLA-DR3 (DRw17) haplotype. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 86, n. 16, p. 6274-6278, 1989.

KAPUSCINSKA, A. et al. Disease specificity and dynamics of changes in IgA class anti-endomysial antibodies in celiac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 6, n. 4, p. 529-534, 1987.

KAUKINEN, K. et al. Celiac disease and autoimmune endocrinologic disorders. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 44, n. 7, p. 1428-1433, 1999.

KAUKINEN, K. et al. Celiac disease without villous atrophy: revision of criteria called for. **Digestive Disease and Science**, New York, v. 46, n. 4, p. 879-887, 2001.

KING, A. L.; CICLITIRA, P. J. Celiac disease: strongly heritable, oligogenic, but genetically complex. **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v. 71, n. 1-2, p. 70-75, 2000.

KINGHAM, J. G.; PARKER, D. R. The association between primary biliary cirrhosis and coeliac disease: a study of relative prevalences. **Gut**, London, v. 42, n. 1, p. 120-122, 1998.

KIRSCHFINK, M. Controlling the complement system in inflammation. **Immunopharmacology**, New York, v. 38, n. 1-2, p. 51-62, 1997.

KOMATIREDDY, G. R. et al. Association of systemic lupus erythematosus and gluten enteropathy. **Southern Medical Journal**, Birmingham, v. 88, n. 6, p. 673-676, 1995.

KOOP, I.; ILCHMANN, R.; IZZI, L. Detection of autoantibodies against tissue transglutaminase in patients with celiac disease and dermatitis herpetiformis. **American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 95, n. 8, p. 2009-2014, 2000.

KORPONAY-SZABO, I. et al. Prospective significance of antiendomysium antibody positivity in subsequently verified celiac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 25, n. 1, p. 56-63, 1997.

KORPONAY-SZABO, I. et al. Families with multiple cases of gluten-sensitive enteropathy. **Zeitschrift fur Gastroenterologie**, Grafelfing, Germany, v. 36, n. 7, p. 553-558, 1998.

KORPONAY-SZABO, I. et al. High prevalence of silent celiac disease in preschool children screened with IgA/IgG antiendomysium antibodies. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 28, n. 1, p. 26-30, 1999.

KOTZE, L. M. S.; FERREIRA, E. Coeliac disease and HLA system. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 231, 1979.

KOTZE, L. M. S. **Padrões histológicos e linfócitos intra-epiteliais da mucosa do intestino delgado nas diarreias crônicas**. Curitiba, 1988. 170f. Dissertação (Mestrado de Medicina Interna) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

KOTZE, L. M. S.; PISANI, J.C. Endoscopia e biópsia per oral do intestino delgado. In: _____. **Diarreias crônicas. Diagnóstico e tratamento**. 1. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p. 85-112.

KOTZE, L. M. S.. Doença Celíaca. In: COELHO, J. C. U. **Aparelho Digestivo. Clínica e Cirurgia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1996. p. 477-488.

KOTZE, L. M. S. et al. Comparação dos anticorpos anti-reticulina e antiendomísio classe IgA para diagnóstico e controle da dieta na Doença Celíaca. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 177-184, 1999.

KOTZE, L. M. S. Distúrbios entéricos da absorção. In: DANI R. **Gastroenterologia Essencial**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001(a). p. 237-250.

KOTZE, L. M. S. et al. Antiendomysium antibodies in Brazilian patients with celiac disease and their first-degree relatives. **Arquivos de Gastroentologia**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 94-103, 2001(b).

KOTZE, L. M. S. et al. IgA class antiendomysial and anti-tissue transglutaminase antibodies in relation to duodenal mucosa changes in celiac disease. **Pathology**, Sydney, v. 35, n.1, p. 56-60, 2003.

LACHMANN, P. J. Complement, alternative pathway. In: ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Encyclopedia of Immunology**. 2. ed. London: Academic Press, 1992. p. 371-372.

LADINSER, B.; ROSSIPAL, E.; PITTSCHIELER, K. Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method. **Gut**, London, v. 35, n. 6, p. 776-778, 1994.

LAMBRIS, J. D.; SAHU, A.; WETSEL, R. A. The chemistry and biology of C3, C4 and C5. In: VOLANAKIS, J. E.; FRANK, M. M. **The Human complement system in health and disease**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 83-118.

LANCASTER-SMITH, M.; JOYCE, S.; KUMAR, P. Immunoglobulins in the jejunal mucosa in adult coeliac disease and dermatitis herpetiformis after the reintroduction of dietary gluten. **Gut**, London, v. 18, n. 11, p. 887-891, 1977.

LANCHBURY, J. S.; PAL, B.; PAPIHA, S. S. Bf and C3 polymorphism in rheumatoid arthritis. **Human Heredity**, Basel, v. 37, n. 3, p. 144-149, 1987.

LAVO, B. et al. Fc receptor function and circulating immune complexes in gluten sensitive enteropathy: possible significance of serum IgA. **Gut**, London, v. 32, n. 8, p. 876-880, 1991.

LERNER, A.; BLANK, M.; SHOENFELD, Y. Celiac disease and autoimmunity. **Israel Journal of Medical Sciences**, Jerusalem, v. 32, n. 1, p. 33-36, 1996.

LERNER, A. et al. Increased prevalence of autoantibodies in celiac disease. **Digestives Diseases and Sciences**, New York, v. 43, n. 4, p. 723-726, 1998.

LEVINE, A.; BUJANOVER, Y.; REIF, S. Comparison of assays for anti-endomysial and anti-transglutaminase antibodies for diagnosis of pediatric celiac disease. **The Israel Medical Association Journal**, Tel Aviv, v. 2, n. 2, p. 122-125, 2000.

LIE, B. A. et al. A gene telomeric of the HLA class I region is involved in predisposition to both type 1 diabetes and coeliac disease. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 54, n. 2, p. 162-168, 1999.

LIPSKER, D. M. et al. Lupus erythematosus associated with genetically determined deficiency of the second component of the complement. **Archives of Dermatology**, Chicago, v. 136, n. 12, p. 1508-1514, 2000.

LISZEWSKI, M. K.; ATKINSON, J. P. Regulatory proteins of complement. In: VOLANAKIS, J. E.; FRANK, M. M. **The Human complement system in health and disease**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 1998, p. 149-165.

LOPEZ-VAZQUEZ, A. et al. MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1*0501/DQB1*0201. **Gut**, London, v. 50, n. 3, p. 336-340, 2002.

LUNDIN, K. E. A. et al Heterogeneous reactivity patterns of HLA DQ. Restricted small intestinal T-cell clones from patients with celiac disease. **Gastroenterology**, New York, v. 112, n. 3, p. 752-759, 1997.

MÄKI, M. et al. Serological markers and HLA genes among healthy first degree relatives of patients with coeliac disease. **The Lancet**, London, v. 338, n. 3779, p.1350-1353, 1991.

MÄKI, M.; COLLIN, P. Coeliac disease. **The Lancet**, London, v. 349, n. 9067, p. 1755-1759, 1997.

MALAVASI, F. et al. Properdin factor B and glioxalase 1 polymorphism in celiac disease. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 303, n. 9, p. 530-531, 1980.

MANNION, A. et al. Extended major histocompatibility complex haplotypes in coeliac patients in the west of Ireland. **American Journal of Medical Genetics**, New York, v. 45, n. 3, p. 373-377, 1993.

MARSH, M. N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. **Gastroenterology**, New York, v. 102, n. 1, p. 330-354, 1992.

MARSH, M. N. Mucosal pathology in gluten sensitivity. In: _____. **Coeliac disease**. Oxford: Blakwell Scientific Publications, 1992. p. 136-191.

MARSH, M. N. The natural history of gluten sensitivity: defining, refining and re-defining. **Quartely Journal of Medicine**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 9-13, 1995.

MASSEY, A.; CAPNER, P. M.; MOWBRAY, J. F. Activation of the alternative pathway by gluten. A possible etiological factor in dermatitis herpetiformis. **Immunology**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 339-342, 1977.

MAUFF, G.; GAUCHEL, F. D.; HITZEROTH, H. W. Polymorphism of properdin factor B in south african, negroid, indian and colored populations. **Human Genetics**, New York, v. 33, n. 3, p. 319-322, 1976.

MAUFF, G.; HITZEROTH, H. W.; KLEEBERG, H. H. Complement haplotypes ("Complotypes") of Bf, C4 and C2 are associated with lepromatous leprosy in negroid patients. **Immunobiology**, Oxford, v. 164, n. 2, p. 274, 1983.

McDONALD, W. C.; DOBBINS, W. O. III; RUBIN, C. E. Studies of the familial nature of celiac sprue using biopsy of the small intestine. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 272, p. 448-456, 1965.

McLEAN, R. H.; WINKELSTEIN, J. A. Genetically determined variation in the complement system: relationship to disease. **Journal of Pediatrics**, St Louis, v. 105, n. 2, p. 179-188, 1984.

McMANUS, R. et al. Association of celiac disease with microsatellite polymorphisms close to the tumor necrosis factor genes. **Human Immunology**, New York, v. 45, n. 1, p. 24-31, 1996(a).

McMANUS, R. et al. TNF2, a polymorphism of the tumour necrosis-alpha gene promoter, is a component of the celiac disease major histocompatibility complex haplotype. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 26, n. 9, p. 2113-2118, 1996(b).

McMILLAN, S. A. et al. Factors associated with serum antibodies to reticulin, endomysium, and gliadin in an adult population. **Gut**, London, v. 39, n. 1, p. 43-47, 1996.

MEARIN, M. L. et al. HLA-DR phenotypes in Spanish coeliac children: their contribution to the understanding of the genetics of the disease. **Gut**, London, v. 24, n. 6, p. 532-537, 1983.

MESSIAS, IJT. et al. Activation of complement pathways in patients with PCM. In: BRAZILIAN MEETING OF IMMUNOLOGY, 1985, Guarujá. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Guarujá, 1985, v. 18, p. 612A.

MESSIAS, I. J. et al. Association of MHC class III complement components C2, BF and C4 with Brazilian Paracoccidioidomycosis. **Complement and Inflammation**, Basel, v. 8, n. 5-6, p. 288-293, 1991.

MESSIAS, I. J. et al. Association of C4B deficiency with Erythema Nodosum leprosum. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 92, n. 2, p. 284-287, 1993.

MESSIAS, I. J. et al. Genetic Variability of the MHC Class III Complement Proteins C2, BF, C4A and C4B in Southern Brazil. **Experimental and Clinical Immunogenetics**, Basel, v. 11, n. 4, p. 192-196, 1994.

MESSIAS, I. J.; CAVALCANTI, E.; RADOMINSKI, S. Increased Frequency of C4A*6 rare allele in Rheumatic Heart Disease. **Scandinavian Journal of Reumatology**, Stockholm, v. 24, n. 3, p. 164-168, 1995.

MEUWISSE, G. W. Diagnostic criteria in coeliac disease. **Acta Paediatrica Scandinavica**, Stockholm, v. 59, p. 461-463, 1970.

MEVORACH, D. et al. Complement dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 188, n. 12, p. 2313-2320, 1998.

MIGONE, N. et al. Bf polymorphism and ankylosing spondylitis. **The Lancet**, London, v. 2, n. 15, p. 163, 1978.

MISIANO, G. et al. Allotipi di C4 e Bf nel diabete insulino-dipendente in pazienti di eta pediatrica. **Rivista Italiana di Pediatria**, Ospedalleto, v. 15, p. 131-136, 1989.

MOHAMMED, I. et al. Multiple immune complexes and hypocomplementaemia in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. **The Lancet**, London, v. 1, n. 7984, p. 487-490, 1976.

MOLBERG, O.; McADAM, S. N.; SOLLID, L. M. Role of tissue transglutaminase in celiac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 30, n. 3, p. 232-240, 2000.

MUKAMEL, M. et al. Celiac disease associated with systemic lupus erythematosus. **Israel Journal of Medical Sciences**, Jerusalem, v. 30, n. 8, p. 656-658, 1994.

MUSTALAHTI, K. et al. Coeliac disease among healthy members of multiple case coeliac disease families. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 37, n. 2, p. 161-165, 2002 (a).

MUSTALAHTI, K. et al. Gluten-free diet and quality of life in patients with screen-detected celiac disease. **Effective Clinical Practice**, Philadelphia, v. 5, n. 3, p. 105-113, 2002 (b).

NALUAI, T. A. T. et al. Genome-wide linkage analysis of Scandinavian affected sib-pairs supports presence of susceptibility loci for celiac disease on chromosomes 5 and 11. **European Journal of Human Genetics**, Basel, v. 9, n. 12, p. 938-944, 2001.

NAVES, M. et al. Complement C4B null allele confers risk for systemic lupus erythematosus in a Spanish population. **European Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 317-320, 1998.

NEMETH, A. et al. Molecular genetic markers of Alzheimer dementia. **Orvosi Hetilapi**, Budapest, v. 136, n. 36, p. 1931-1935, 1995.

NISHIMUKAI, H. et al. Complement allotypes in Japanese patients with pemphigus and bullous pemphigoid. **Dermatologica**, Basel, v. 182, n. 3, p. 164-167, 1991.

NISIHARA, M. N. et al. Prevalência de doença calíaca na região sul do Brasil. In: SEMANA BRASILEIRA DO APARELHO DIGESTIVO, 5, 2002, Rio de Janeiro. **Anais da V Semana Brasileira do Aparelho Digestivo**, Rio de Janeiro, 2002, p. 19-20.

NIVELONI, S. et al. Gluten sensitivity in patients with primary biliary cirrhosis. **American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 93, n. 3, p. 404-408, 1998.

NIVELONI, S. et al. The natural history of gluten sensitivity: report of two new celiac disease patients resulting from a long-term follow-up of nonatrophic first-degree relatives. **American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 95, n. 2, p. 463-468, 2000.

NOT, T. et al. Celiac disease risk in the USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in health blood donors. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 33, n. 5, p. 494-498, 1998.

NUMANO, F. et al. Hereditary factors in Takayasu disease. Polymorphism of human complements. **Experimental and Clinical Immunogenetics**, Basel, v. 6, n. 3, p. 236-244, 1989.

ORREN, A.; PRESCOTT, R. A. BF*F1 and C2² gene frequencies in patients with insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) from three South African populations. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 22, n. 5, p. 385-388, 1983.

PACHT, A. et al. The diagnostic reliability of anti-endomysial antibody in celiac disease: The north Israel experience. **Israel Journal of Medical Sciences**, Jerusalem, v. 31, n. 4, p. 218-220, 1995.

PARTANEN, J. et al. HLA-linked heat-shock protein 70 (HSP70-2) gene polymorphism and celiac disease. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 41, n. 1, p. 15-19, 1993.

PAULLEY, L. W. Observation on the aetiology of idiopathic steatorrhoea. **British Medical Journal**, London, v. 2, n. 4, p. 1318-1321, 1954.

PENA, A. S. et al. Genetic basis of gluten-sensitive enteropathy. **Gastroenterology**, New York, v. 75, n. 2, p. 230-235, 1978.

PENA, A. S.; GARROTE, J. A.; CRUSIUS, J. B. Advances in the immunogenetics of coeliac disease. Clues for understanding the pathogenesis and disease heterogeneity. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 225, p. 56-58, 1998.

PENA, A. S.; WIJMEGA, C. Genetic factors underlying gluten-sensitive enteropathy. **Current Allergy and Asthma Reports**, Philadelphia, v. 1, n. 6, p. 526-533, 2001.

PEROUTKA, S. J.; PRICE, S. C.; JONES, K. W. The comorbid association of migraine with osteoarthritis and hypertension: complement C3F and Berkson's bias. **Cephalalgia**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 23-26, 1997.

PICARELLI, A. et al. Gluten sensitive disease with mild enteropathy. **Gastroenterology**, New York, v. 111, n. 3, p. 608-616, 1996.

PLOSKI, R. et al. On the HLA-DQ($\alpha 1^*0501$, $\beta 1^*0201$)-associated susceptibility in celiac disease: A possible gene dosage effect of *DQB1^*0201*. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 41, n. 4, p. 173-177, 1993.

PLOSKI, R.; ASCHER, H.; SOLLID L. M. HLA Genotypes and the increased incidence of coeliac disease in Sweden. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 31, n. 2, p. 1092-1097, 1996.

POLVI, A.; MAKI, M.; PARTANEN, J. Celiac patients predominantly inherit HLA-DPB1*0101 positive haplotype from HLA-DQ2 homozygous parent. **Human Immunology**, New York, v. 53, n. 2, p. 156-158, 1997.

PORCEL, J. M.; VERGANI, D. El sistema complemento: una fascinante cascata biológica. **Medicina Clínica**, Barcelona, v. 100, n. 11, p. 428-435, 1993.

POWIS, S.H. et al. TAP1 and TAP2 polymorphism in coeliac disease. **Immunogenetics**, New York, v. 38, n. 5, p. 345-350, 1993.

PRODINGER, W. H. et al. Complement. In: PAUL, W. **Fundamental Immunology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p. 967-995.

RAMBAUSEK, M. et al. Genetic polymorphism of C3 and Bf in IgA nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Belfast, v. 2, n. 4, p. 208-211, 1987.

RAUM, D. et al. Genetic marker for insulin-dependent diabetes mellitus. **The Lancet**, London, v. 1, n. 8128, p. 1208-1210, 1979.

REID, K. B. M. C1q and mannose-binding lectin. In: VOLANAKIS, J. E.; FRANK, M. M. **The human complement system in health and disease**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 33-48.

RISCH, N. Linkage strategies for genetically complex traits. II. The power of affected relative pairs. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 46, n. 2, p. 229-241, 1990.

RITTMAYER, C.; RHOADS, M. IgA deficiency causes false-negative endomysial antibody result in Celiac Disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 23, n. 4, p. 504-506, 1996.

RITTNER, C. et al. Celiac disease and C4A*Q0: an association secondary to HLA DR3. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 23, n. 2, p. 130-134, 1984.

RITTNER, C.; SCHNEIDER, P. M. Genetics and polymorphism of the complement components. In: ROTHER, K.; TILL, G. O. **The complement system**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. p. 80-135.

RITTNER, C.; SCHNEIDER, P. M. Complexity of MHC class III genes and complement polymorphism. **Immunology Today**, Cambridge, v. 10, n. 12, p. 401-403, 1989.

RITTNER, C. Complement, genetics. In: ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Encyclopedia of Immunology**. 2. ed. London: Academic Press, 1992. p. 382-385.

RIZZETO, M.; SWANA, G.; DONIACH, D. Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 331-344, 1973.

ROITT, I.; BROSTOFF, J. MALE, D. Complement. In: _____. **Immunology**. 4. ed. London: Mosby, 1996, p. 13.1-13.17.

ROMALDINI, C. C.; BARBIERI, D. Estudo do anticorpo sérico antigliadina da classe imunoglobulina A na doença celíaca. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 254-261, 1997.

ROSCHMANN, E. et al. T-Cell receptor variable genes and genetic susceptibility to celiac disease: an association and linkage study. **Gastroenterology**, New York, v. 105, n. 6, p. 1790-1796, 1993.

ROSENBERG, W. M. et al. A locus telomeric to HLA-DPB encodes susceptibility to coeliac disease. **Immunogenetics**, New York, v. 30, n. 4, p. 307-310, 1989.

ROSS, G. D. Complement receptors. In: ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Encyclopedia of Immunology**. 2. ed. London: Academic Press, 1992. p. 388-391.

ROSTAMI, K. et al. Sensitivity of antiendomysium and antigliadin antibodies in untreated celiac disease: disappointing in clinical practice. **American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 94, n. 4, p. 888-894, 1999.

ROTHER, K. O.; ROTHER, U. Complement deficiencies. In: ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Encyclopedia of Immunology**. 2. ed. London: Academic Press, 1992. p. 378-380.

RYDER, L. P.; SVEJGAARD, A. Genetics of HLA disease association. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 15, p. 169-187, 1981.

SARDY, M.; KARPATI, S.; PETERFY, F. Comparison of a tissue transglutaminase ELISA with the endomysium antibody test in the diagnosis of gluten-sensitivity enteropathy. **Zeitschrift fur Gastroenterologie**, Grafelfing, v. 38, n. 5, p. 357-364, 2000.

SATEGNA-GUIDETTI, C. et al. Comparison of serum anti-gliadin, anti-endomysium and anti-jejunum antibodies in adult celiac sprue. **Journal of Clinical Gastroenterology**, New York, v. 20, n. 1, p. 17-21, 1995.

SATEGNA-GUIDETTI, C. et al. Autoimmune thyroid diseases and coeliac disease. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, [S.I.], v. 10, n. 11, p. 927-931, 1998.

SATEGNA-GUIDETTI, C. et al. Prevalence of thyroid disorders in untreated adult celiac disease patients and effect of gluten withdrawal: An Italian multicenter study. **American Journal of Gastroenterology**, New York, v.96, n. 3, p. 751-757, 2001.

SAUKKONEN, T. et al. Prevalence of coeliac disease in siblings of patients with Type I diabetes is related to the prevalence of DQB1*02 allele. **Diabetologia**, New York, v. 44, n. 8, p. 1051-1053, 2001.

SCHUPPAN, D.; DIETERICH, W.; RIECKEN, E. O. Exposing gliadin as a tasty food for lymphocytes. **Nature Medicine**, New York, v. 4, n. 6, p. 666-667, 1998.

SCHUPPAN, D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. **Gastroenterology**, New York, v. 119, n. 1, p. 234-242, 2000.

SCOTT, B. B.; SCOTT, D. G.; LOSOWSKY, M. S. Jejunal mucosal immunoglobulins and complement in untreated coeliac disease. **Journal of Pathology**, Sussex, v. 121, n. 4, p. 219-223, 1977.

SCULLY, L. P. et al. Early-onset autoimmune hepatitis is associated with a C4A gene deletion. **Gastroenterology**, New York, v. 104, n. 5, p. 1478-1484, 1993.

SEAH, P. P. et al. Antireticulin antibodies in childhood celiac disease. **The Lancet**, London, v. 2, n. 7726, p. 681-682, 1971.

SEGURADO, O. G. et al. C4 Chido 3 and 6 distinguish two diabetogenic haplotypes: HLA B49, SC01, DR4, DQW8 and B8, SC01, DR3, DQW2. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 183, n. 1-2, p. 12-22, 1991.

SHAN, L. et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. **Science**, Washington, v. 297, n. 5590, p. 2275-2279, 2002.

SHEEHAN, N. J.; STANTON-KING, K. Polyautoimmunity in a young woman. **British Journal of Rheumatology**, London, v. 32, n. 3, p. 254-256, 1993.

SILVA, M. B. G. **Polimorfismo genético de C3 e BF do sistema complemento em lúpus eritematoso sistêmico**. Curitiba, 1997. 102 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

SILVA, E. M. et al. Human leukocyte antigen class II alleles in white Brazilian patients with celiac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 31, n. 4, p. 391-394, 2000.

SIM, R. B. Complement, classical pathway. In: ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Encyclopedia of Immunology**. 2. ed. London: Academic Press, 1992. p. 373-377.

SIM, R. B.; LAICH, A. Serine proteases of the complement system. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 28, n. 5, p. 545-550, 2000.

SJOBERG, K.; LINDGREN, S.; ERIKSSON, S. Frequent occurrence of non-specific gliadin antibodies in chronic liver disease. Endomysial but not gliadin antibodies predict coeliac disease in patients with chronic liver disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 32, n. 11, p. 1162-1167, 1997.

SOLLID, L. M. et al. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ α/β heterodimer. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 169, n. 1, p. 345-350, 1989.

SOLLID, L. M.; THORSBY, E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. **Gastroenterology**, New York, v. 105, n. 3, p. 910-922, 1993.

SOLLID, L. M. Molecular basis of celiac disease. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.18, n. 1, p. 53-81, 2000.

SOLLID, L. M. et al. Genes and environment in celiac disease. **Acta Odontologica Scandinavica**, Oslo, v. 59, n. 3, p. 183-186, 2001.

SORENSEN, H. T. et al. Risk of primary biliary liver cirrhosis in patients with coeliac disease: Danish and Swedish cohort data. **Gut**, London, v. 44, n. 5, p. 736-738, 1999.

SPURKLAND, A. et al. HLA-DR and -DQ genotypes of celiac disease patients serologically typed to be non-DR3 or non-DR5/7. **Human Immunology**, New York, v. 35, n. 3, p. 188-192, 1992.

STANEKOVA, D.; STARSIA, Z.; NIKS, M. Genetic polymorphism of factor B of the complement system (Bf) in the Slovak population. **Folia Biologica (Praha)**, Praha, v. 36, n. 5, p. 236-239, 1990.

STANEKOVA, D. et al. Genetic polymorphism of factor B (Bf) and C3 component of complement in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus: BFQ0 allele observed in a diabetic child. **Folia Biologica (Praha)**, Praha, v. 39, n. 3, p. 117-123, 1993.

STENHAMMAR, L. Childhood celiac disease in Sweden. **The Lancet**, London, v. 344, n. 8918, p. 341-342, 1994.

STOKES, P. L. et al. Histocompatibility antigens associated with adult coeliac disease. **The Lancet**, London, v. 2, n. 7769, p. 162-164, 1972.

SUMNIK, Z. et al. HLA-DQA1*05-DQB1*0201 positivity predisposes to coeliac disease in Czech diabetic children. **Acta Paediatrica**, Oslo, v. 89, n. 12, p. 1426-1430, 2000.

SUPER, M. et al. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. **The Lancet**, London, v. 2, n. 8674, p. 1236-1239, 1989.

TALAL, A. H. et al. Celiac disease in an adult population with insulin-dependent diabetes mellitus: use of endomysial antibody testing. **American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 92, n. 8, p. 1280-1284, 1997.

TEISBERG, P. et al. Complement system studies in adult coeliac disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 12, p. 873-876, 1977.

TENG, Y. S.; TAN, S. G. Subtyping of properdin factor B (BF) by isoelectrofocusing. **Human Heredity**, Basel, v. 32, n. 5, p. 362-366, 1982.

THOMSON, G. HLA disease association: models for the study of complex human genetic disorders. **Critical Review in the Clinical Laboratory Sciences**, Cleveland, v. 32, n. 2, p. 183-219, 1995.

TOKUNAGA, K. et al. Polymorphism of properdin factor B in Japanese. Description of a rare variant and data of association with HLA and C2. **Human Genetics**, New York, v. 60, n. 1, p. 42-45, 1982.

TOSCANO, V. et al. Importance of gluten in the induction of endocrine autoantibodies and organ dysfunction in adolescent celiac patients. **American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 95, n. 7, p. 1742-1748, 2000.

TOSI, R. et al. Evidence that celiac disease is primarily associated with a DC locus allelic specificity. **Clinical Immunology and Immunophatology**, New York, v. 28, n. 3, p. 395-404, 1983.

TRABACE, S. et al. HLA-ABC and DR antigens in celiac disease. **Vox Sanguinis**, Basel, v. 46, n. 2, p. 102-106, 1984.

TRANTAPHYLIDIS, C. D. et al. Complement polymorphism in Greece. **Annals of Human Biology**, London, v. 16, n. 5, p. 443-448, 1989.

TRONCONE, R. et al. Latent and potential coeliac disease. **Acta Paediatrica Supplement**, Oslo, v. 412, p. 10-14, 1996(a).

TRONCONE, R.; GRECO, L.; AURICCHIO, S. Gluten-sensitive enteropathy. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 43, n. 2, p. 355-373, 1996(b).

TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunology Today**, Cambridge, v. 17, n. 11, p. 532-540, 1996.

TURSI, A. et al. Prevalence and clinical presentation of subclinical/silent celiac disease in adults: an analysis on a 12-year observation. **Hepatogastroenterology**, Stuttgart, v. 48, n. 38, p. 462-464, 2001.

UNSWORTH, D. J. et al. Binding to wheat gliadin in vitro to reticulin in normal and dermatitis herpetiformis skin. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 76, n. 2, p. 88-92, 1981.

UNSWORTH, D. J. et al. Extracts of wheat gluten activate complement via the alternative pathway. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 94, n. 3, p. 539-543, 1993.

UNSWORTH, D. J.; BROWN, D. L. Serological screening suggests that adult coeliac disease is underdiagnosed in the UK and increases the incidence by up to 12%. **Gut**, London, v. 35, n. 1, p. 61-64, 1994.

UTIYAMA, S. R. R.; IOSHII, S. Doença Celíaca: uma visão atual. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 151-154, 1998.

UTIYAMA, S. R. R. et al. Spectrum of autoantibodies in celiac patients and relatives. **Digestive Disease and Science**, New York, v. 46, n. 12, p. 2624-2630, 2001.

UTIYAMA, S. R. R. et al. Correlação dos anticorpos antiendomísio e antitransglutaminase com a doença celíaca. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 1, p.39-45, 2002.

VARCEL, Y. et al. Simultaneous occurrence of systemic lupus erythematosus and coeliac disease-like features. **Postgraduate Medical Journal**, Basingstoke, v. 65, n. 766, p. 600-602, 1989.

VAZQUEZ, H. et al. Screening for asymptomatic celiac sprue in families. **Journal of Clinical Gastroenterology**, New York, v. 21, n. 2, p. 130-133, 1995.

VAZQUEZ, H. et al. Serological markers identify histologically latent coeliac disease among first-degree relatives. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, [S.I.], v. 8, n. 1, p. 15-21, 1996.

VELLUZZI, F. et al. Thyroid and celiac disease: clinical, serological and echograph study. **American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 93, n. 6, p. 976-979, 1998.

VENTURA, A.; MAGAZZU, G.; GRECO, L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. **Gastroenterology**, New York, v. 117, n. 2, p. 297-303, 1999.

VILPPULA, A. H.; AINE, R. A. Polymyositis associated with several immunological disorders. **Clinical Rheumatology**, Belgium, v. 3, n. 4, p. 533-539, 1984.

VITORIA, J. C. et al. Association of insulin-dependent diabetes mellitus and celiac disease: a study based on serologic markers. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 27, n. 1, p. 47-52, 1998.

VOLANAKIS, J. E. Overview of the complement system. In: VOLANAKIS, J. E.; FRANK, M. M. **The human complement system in health and disease**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 9-32.

VOLTA, U. et al. IgA anti-endomysial antibodies on human umbilical cord tissue for celiac disease screening. **Digestive Disease and Sciences**, New York, v. 40, n. 9, p. 1902-1905, 1995.

VOLTA, U. et al. Organ-specific autoantibodies in coeliac disease: do they represent an epiphenomenon or the expression of associated autoimmune disorders? **Italian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Padova, v. 29, n. 1, p. 18-21, 1997.

VOLTA, U. et al. Frequency and significance of anti-gliadin and anti-endomysial antibodies in autoimmune hepatitis. **Digestive Diseases and Science**, New York, v. 43, n. 10, p. 2190-2195, 1998.

WALKER-SMITH, J. A. et al. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. **Archives of Disease in Childhood**, London, v. 65, n. 8, p. 909-911, 1990.

WALPORT, M. J. Complement. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 344, n.14, p. 1058-1066, 2001(a).

WALPORT, M. J. Complement. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 344, n.14, p. 1140-1144, 2001(b).

WATZCO, W.; MESSIAS, I. J. Associação entre as variantes genéticas de C3, BF, C4A e C4B do Sistema Complemento e Artrite Reumatóide, **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 243-252, 1994.

WEBSTER, A. D. et al. Coeliac disease with severe hypogammaglobulinaemia. **Gut**, London, v. 22, n. 2, p. 153-157, 1981.

WELCH, T. R.; FRENZKE, M. Glomerulonephritis associated with deficiencies and polymorphisms of complement components encoded in the class III region of the MHC. **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**, Tampa, v. 6, p. D898-903, 2001.

ZHONG, F. et al. An autosomal screen for genes that predispose to celiac disease in the western countries of Ireland. **Nature Genetics**, New York, v. 14, n. 3, p. 329-333, 1996.

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES: NOME, GRUPO, IDADE, SEXO, FENÓTIPOS DE BF, ANTICORPOS ANTIENDOMÍSIO (EmA-IgA), GRAU DE LESÃO DA BIÓPSIA E OUTROS AUTO-ANTICORPOS	162
APÊNDICE 2 – DADOS REFERENTES AO GRUPO CONTROLE: NOME, IDADE, SEXO, FENÓTIPOS DE BF, ANTICORPOS ANTIENDOMÍSIO (EmA-IgA) E OUTROS AUTO-ANTICORPOS	165
APÊNDICE 3 – DADOS REFERENTES AOS "FAMILIARES EmA+": NOME, IDADE, SEXO, FENÓTIPOS DE BF, ANTICORPOS ANTIENDOMÍSIO (EmA-IgA), GRAU DE LESÃO DA BIÓPSIA E PRESENÇA DE AUTO-ANTICORPOS	169
APÊNDICE 4 – COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALELOS DE BF ENTRE OS "FAMILIARES EmA+" E OS PACIENTES, CONTROLES E "FAMILIARES EmA-"	170
APÊNDICE 5 – FREQUÊNCIAS GÊNICAS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO ...	171
APÊNDICE 6 – COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF ENTRE OS GRUPOS EM ESTUDO EM RELAÇÃO AO SEXO DOS INDIVÍDUOS (F x F; M x M)	172

**APÊNDICE 1 - DADOS REFERENTES AOS PACIENTES: NOME, GRUPO, IDADE, SEXO, FENÓTIPOS DE BF, ANTICORPOS
ANTIENDOMÍSIO (EmA-IgA), GRAU DE LESÃO DA BIÓPSIA E OUTROS AUTO-ANTICORPOS**

continua

N	NOME	GRUPO*	IDADE	SEXO	BF	EmA-IgA	BIÓPSIA	AML	AMA	LKM	ANA	CGP	AAM
1	DW	RD	33	F	F	Pos. 1/80	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2	CMF	RD	65	F	F	Pos. 1/10	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
3	JNM	RD	57	F	S	Pos. <1/5	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
4	CK	RD	19	M	SS07	Pos. 1/10	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
5	AMMP	RD	16	F	S	Pos. 1/10	-	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos1/10
6	ES	RD	53	F	S	Pos. 1/20	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
7	RD	RD	27	F	S	Pos. 1/80	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos1/10
8	LMO	RD	22	F	SF	Pos. 1/40	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
9	HJ	RD	48	M	S	Pos. 1/80	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
10	OB	RD	66	M	S	Pos. 1/40	IV	Neg	Neg	Neg	Pos. 1/40	Neg	Neg
11	MSM	RD	51	F	SF	Pos. 1/10	IV;III	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos1/10
12	EB	RD	63	F	SF	Pos. 1/80	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
13	SG	RD	38	F	SF	Pos. 1/20	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
14	IBMC	RD	51	F	SF	Pos. 1/40	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
15	LDR	RD	29	F	SF	Pos. 1/40	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
16	RSM	RD	37	F	SF	Pos. <1/5	II	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
17	AMM	RD	46	F	S	Pos. 1/20	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
18	BR	RD	03	M	S	Pos. 1/10	II	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
19	SSF	RD		M	F	Pos. 1/10	-	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
20	SEF	RD	43	F	SF	Pos. 1/20	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
21	EM	RD	49	F	SS07	Pos. 1/80	IV	Pos. 1/40	Neg	Neg	Pos. 1/20	Neg	Neg
22	NFF	RD	43	M	S	Pos. 1/5	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
23	AHL	RD	45	F	S	Pos. 1/20	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
24	RTJ	RD	38	F	F	Pos. 1/40	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
25	CAR	RD	35	M	SF	Pos. 1/10	-	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
26	LC	RD	05	F	S	Pos. 1/40	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
27	KRP	RD	23	F	S	Pos. 1/40	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
28	NBS	RD	29	F	S	Pos. 1/80	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
29	MCG	RD	49	F	SF	Pos. 1/10	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

**APÊNDICE 1 - DADOS REFERENTES AOS PACIENTES: NOME, GRUPO, IDADE, SEXO, FENÓTIPOS DE BF, ANTICORPOS
ANTIENDOMÍSIO (EmA-IgA), GRAU DE LESÃO DA BIÓPSIA E OUTROS AUTO-ANTICORPOS**

												continuação	
N	NOME	GRUPO*	IDADE	SEXO	BF	EmA-IgA	BIÓPSIA	AML	AMA	LKM	ANA	CGP	AAM
30	SM	RD	71	F	S	Pos. <1/5	II	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
31	GF	RD	57	M	S	Pos. 1/80	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
32	KR	RD	22	F	S	Pos. 1/40	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
33	EMV	RD	48	F	S	Pos. 1/10	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
34	MCC	SG	27	F	S	Neg	IV;II	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
35	JT	SG	10	M	SF	Neg	III;II	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
36	CCF	SG	18	F	S	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Pos. 1/40	Neg	Pos 1/40
37	DG	SG	44	F	S	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
38	BLS	SG	06	F	SF	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
39	ACA	SG	46	F	SF	Neg	II	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos 1/20
40	FF	SG	13	M	S	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Pos. 1/20	Neg	Neg
41	TB	SG	54	F	SF1	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Pos. 1/80	Neg	Neg
42	MM	SG	18	M	SF1	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
43	CC	SG	32	F	SF	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
44	MPS	SG	17	F	S	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
45	PHM	SG	33	M	S	Neg	-	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
46	GS	SG	02	F	SF1	Neg	III	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
47	IT	SG	34	F	SF1	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos>1/80	Neg
48	ZN	SG	77	F	S	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Pos. 1/40	Neg	Pos 1/20
49	AM	SG	66	F	SF	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
50	FB	SG	13	M	SF	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
51	GSS	SG	54	M	S	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
52	JÁ	SG	28	F	S	Neg	III;II	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
53	DC	SG	22	F	SF	Neg	III	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
54	JD	SG	57	F	SS07	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
55	FV	SG	18	M	F1S07	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
56	AB	SG	22	M	S	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
57	HSK	SG	40	F	S	Neg	IV;II	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
58	JGS	SG	61	F	S	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
59	HS	SG	55	F	SF	Neg	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

**APÊNDICE 1 - DADOS REFERENTES AOS PACIENTES: NOME, GRUPO, IDADE, SEXO, FENÓTIPOS DE BF, ANTICORPOS
ANTIENDOMÍSIO (EmA-IgA), GRAU DE LESÃO DA BIÓPSIA E OUTROS AUTO-ANTICORPOS**

N	NOME	GRUPO*	IDADE	SEXO	BF	EmA-IgA	BIÓPSIA	AML	AMA	LKM	ANA	conclusão	
												CGP	AAM
60	IB	CG	36	F	S	Pos. 1/20	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
61	DFE	CG	12	M	SF	Pos. 1/20	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
62	MTN	CG	33	M	S	Pos. <1/5	II	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
63	LP	CG	31	F	SS07	Pos. <1/5	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
64	FDA	CG	13	M	S	Pos. 1/10	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
65	RMF	CG	30	F	S	Pos. <1/5	IV	Pos. 1/40	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
66	LP	CG	11	F	SF1	Pos. <1/5	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
67	ABR	CG	50	F	S	Pos. 1/10	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
68	SRSB	CG	40	F	S	Pos. <1/5	IV	Pos. 1/40	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos 1/40
69	HJM	CG	12	M	S	Pos. <1/5	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
70	NV	CG	56	F	S	Pos. <1/5	-	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos>1/80	Pos 1/80
71	RH	CG	43	F	S	Pos. 1/5	II	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
72	ACLM	CG	09	F	S	Pos. 1/80	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
73	LH	CG	21	F	S	Pos. 1/10	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
74	APT	CG	12	F	S	Pos. 1/10	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
75	APN	CG	14	F	S	Pos. 1/40	IV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
76	MTE	CG	44	F	SF	Pos. 1/5	IV;II	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

NOTAS: *GRUPO: RD= paciente recém diagnosticado

SG= paciente sem glúten

CG= paciente com glúten

BIÓPSIAS: dados ao diagnóstico. Aquelas em negrito tiveram a coleta simultânea à do sangue para o EmA-IgA e demais auto-anticorpos

BF= fator B; AML= anticorpo antimúsculo liso; AMA= anticorpo antimitocôndria; LKM= anticorpo antimicrosoma de fígado e rim;

ANA= anticorpo antinuclear; CGP= anticorpo anticélula gástrica parietal; AAM= anticorpo antimicrosomal tireoideano

Pos.= positivo

Neg=negativo

**APÊNDICE 2 - DADOS REFERENTES AO GRUPO CONTROLE : NOME , IDADE, SEXO, FENÓTIPOS DE BF, ANTICORPOS ANTI
ENDOMÍLIO (EmA-IgA) E OUTROS AUTO -ANTICORPOS**

											continuação
N	NOME	IDADE	SEXO	BF	EmA-IgA	AML	AMA	LKM	ANA	CGP	AAM
30	PM	22	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos 1/80
31	CA	23	M	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
32	RTSG	37	F	F	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
33	MRG	24	M	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
34	EOC	26	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
35	CAM	23	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
36	MG	30	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
37	MMS	29	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
38	GPFB	36	F	SF1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
39	ALV	28	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
40	AS	28	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
41	LO	31	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
42	SBIA	32	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
43	CS	26	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
44	CAMA	36	M	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
45	MIM	29	M	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
46	RIIC	41	F	SS07	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
47	STH	45	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
48	CTK	40	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
49	OOJ	44	M	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
50	IASN	34	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
51	KRM	24	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
52	CD	23	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos. 1/20
53	MV	24	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
54	KRG	23	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
55	AF	22	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
56	GB	23	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
57	ALC	23	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
58	FAS	21	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
59	CFN	23	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg

**APÊNDICE 2 - DADOS REFERENTES AO GRUPO CONTROLE: NOME, IDADE, SEXO, FENÓTIPOS DE BF, ANTICORPOS ANTI
ENDOMÍLIO (EmA-IgA) E OUTROS AUTO-ANTICORPOS**

											continuação
N	NOME	IDADE	SEXO	BF	EmA-IgA	AML	AMA	LKM	ANA	CGP	AAM
60	TPBM	19	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
61	DHBM	16	M	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
62	AFC	56	F	FS07	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
63	ASAS	64	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
64	JC	65	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
65	AMG	71	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
66	BLS	70	M	SF	Neg	Pos. 1/40	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
67	FO	8	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
68	DN	8	M	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
69	FAS	3	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
70	VPVA	2	M	FF1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
71	AMM	14	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
72	CSD	6	M	FF1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
73	FCB	11	M	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
74	JSSC	6	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
75	SRS	12	M	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
76	LM	1	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
77	JOL	6	M	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
78	RFS	7	M	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos. 1/20
79	MFA	3	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
80	TFC	8	M	SS07	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
81	STS	17	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
82	EM	21	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
83	ELHS	16	M	SS07	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
84	CR	17	F	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
85	MGF	19	M	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
86	VF	20	M	FS07	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
87	MR	19	M	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
88	AS	21	M	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg

**APÊNDICE 2- DADOS REFERENTES AO GRUPO CONTROLE: NOME, IDADE, SEXO, FENÓTIPOS DE BF, ANTICORPOS ANTI
ENDOMÍCIO (EmA-IgA) E OUTROS AUTO-ANTICORPOS**

Nº	NOME	IDADE	SEXO	BF	EmA-IgA	AML	AMA	LKM	ANA	CGP	conclusão
											AAM
89	CES	17	M	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
90	ECG	13	M	SF1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
91	AMB	15	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
92	APA	14	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
93	SPR	17	F	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
94	AL	15	M	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
95	PCM	14	M	S	Neg	Pos. 1/40	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
96	MCP	20	M	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
97	KC	37	M	SF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	neg

NOTAS: BF= fator B; AML= anticorpo antimúsculo liso; AMA= anticorpo antimitocôndria; LKM= anticorpo antimicrosoma de fígado e rim;

ANA= anticorpo antinuclear; CGP= anticorpo anticélula gástrica parietal; AAM= anticorpo antimicrosomal tireoideano

Pos.= positivo

Neg= negativo

APÊNDICE 3 - DADOS REFERENTES AOS "FAMILIARES EmA+": NOME, IDADE, SEXO, FENÓTIPOS DE BF, ANTICORPOS ANTIENDOMÍSIO (EmA-IgA), GRAU DE LESÃO DA BIÓPSIA E PRESENÇA DE AUTO-ANTICORPOS

N	NOME	IDADE	SEXO	BF	EmA-IgA	BIÓPSIA	AUTO-ANTICORPOS
1	LHK	39	F	S	Neg	IV	AAM 1:10
2	IT	35	F	SF	Pos.1:2,5	-	AAM 1:10
3	RF	36	M	F	Pos.1:2,5	-	Neg
4	IL	71	F	SF1	Pos.1:2,5	II	Neg
5	NS	34	M	S	Pos.1:2,5	II	Neg
6	MTF	65	M	S	Pos.1:2,5	II	Neg
7	CS	6	F	SF	Neg	IV	Neg
8	AF	17	F	S	Pos.1:2,5	-	Neg
9	SF	40	F	S	Pos.1:2,5	-	ANA 1:40 AAM 1:40
10	JH	13	M	S	Pos.1:2,5	-	Neg
11	JMN	35	M	S	Pos.1:5	-	Neg
12	FB	24	M	SF	Pos.1:5	II	Neg
13	JB	20	M	S	Pos.1:2,5	-	Neg
14	TP	33	F	S	Pos.1:2,5	-	Neg
15	CSS	40	F	S	Pos.1:80	-	Neg
16	WS	44	M	S	Pos.1:5	II	Neg
17	PJ	21	F	S	Pos.1:80	IV	Neg
18	JC	22	F	SF	Neg	III	Neg
19	MM	45	F	SS07	Pos.1:5	II	Neg
20	EP	51	F	S	Pos.1:2,5	-	Neg
21	RMV	45	F	S	Pos.1:40	IV	Neg
22	ACM	11	M	SF	Pos.1:20	-	Neg
23	CV	18	F	S	Pos.1:40	-	Neg

NOTAS: Biópsias: dados ao diagnóstico. Aquelas em negrito tiveram a coleta simultânea à do sangue para o EmA-IgA e demais auto-anticorpos

AAM: anticorpo antimicrosomal da tireóide; ANA: anticorpo antinuclear

Pos.= positivo; Neg= negativo

APÊNDICE 4 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALELOS DE BF ENTRE OS "FAMILIARES EmA+" E OS PACIENTES, CONTROLES E "FAMILIARES EmA-"

FENÓTIPO BF	"Familiares EmA+" N=23(%)	Pacientes N=47(%)	Controles N=97(%)	"Familiares EmA-" N=127(%)
SF	5 (21,7)	14 (29,8)	34 (35,0)	22 (17,3)
S	15 (65,2)	26 (55,3)	51 (52,6)	93 (73,2)
F	1 (4,35)	0 (0)	2 (2,06)	1 (0,79)
SS07	1 (4,35)	2 (4,25)	3 (3,1)	3 (2,36)
SF1	1 (4,35)	5 (10,6)	3 (3,1)	7 (5,5)
FF1	0 (0)	0 (0)	2 (2,06)	1 (0,79)
FS07	0 (0)	0 (0)	2 (2,06)	0 (0)
F1S07	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

ALELO DE BF				
S	22 (95,6)	47 (100)	91 (93,8)	125 (98,4)
F	6 (26,1)	14 (29,8)	40 (41,2)	24 (18,9)
F1	1 (4,35)	5 (10,6)	5 (5,15)	8 (6,3)
S07	1 (4,35)	2 (4,25)	5 (5,15)	3 (2,36)

NOTAS: *"Familiares EmA+" x pacientes, controles e "familiares EmA-"= não significante para todos os fenótipos e alelos

*Pacientes x controles= não significante para todos os fenótipos e alelos

*"Familiares EmA-" x controles= fenótipo BF SF: p=0,002; pc=0,006

fenótipo BF S: p=0,001; pc=0,003; RR=2,46

alelo BF*S: p=0,069; pc=0,207; RR=4,12

alelo BF*F: p=0,0002; pc=0,0006

*Pacientes x "familiares EmA-"= fenótipo BF SF: p=0,058; pc=0,174; RR=2,02

fenótipo BF S: p=0,020; pc=0,060

*Teste exato de Fisher

APÊNDICE 5 - FREQUÊNCIAS GÊNICAS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO

ALELO DE BF	Pacientes totais (n=76)	Pacientes das famílias (n=47)	Familiares totais (n=150)	"Familiares EmA+" (n=23)	"Familiares EmA-" (n=127)	Controles (n=97)
BF*S	0,743	0,777	0,850	0,804	0,858	0,732
BF*F	0,184	0,149	0,107	0,152	0,098	0,216
BF*F1	0,039	0,053	0,030	0,022	0,032	0,026
BF*S07	0,033	0,021	0,013	0,022	0,012	0,026
TOTAL	1	1	1	1	1	1

APÊNDICE 6 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF ENTRE OS GRUPOS EM ESTUDO EM RELAÇÃO AO SEXO DOS INDIVÍDUOS (F x F; M x M)

FENÓTIPO BF	Paciente x Familiar (n=47) (n=150)		Paciente x "Familiar EmA-" (47) (127)		Paciente x "Familiar EmA+" (N=47) (N=23)		Paciente x Controle (N=76) (N=97)	
	F x F (35) (87)	M x M (12) (63)	F x F (35) (73)	M x M (12) (54)	F x F (35) (14)	M x M (12) (9)	F x F (56) (67)	M x M (20) (30)
SF	11 17	3 10	11 14	3 8	11 3	3 2	16 27	4 7
S	18 63 ⁽¹⁾	8 45	18 54 ⁽²⁾	8 39	18 9	8 6	30 34	12 17
F	0 1	0 1	0 1	0 0	0 0	0 1	3 2	1 0
SS07	2 2	0 2	2 1	0 2	2 1	0 0	3 1	1 2
SF1	4 3	1 5	4 2	1 5	4 1	1 0	4 2	1 1
FF1	0 1	0 0	0 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 2
FS07	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 1	0 1
FISO7	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0

FENÓTIPO BF	Familiar x Controle (N=150) (N=97)		"Familiar x Controle EmA-" (N=127) (N=97)		Família x Controle completa (197) (97)		"Familiar x Controle EmA+" (N=23) (N=97)	
	F x F (87) (67)	M x M (63) (30)	F x F (73) (67)	M x M (54) (30)	F x F (122) (67)	M x M (75) (30)	F x F (14) (67)	M x M (9) (30)
SF	17 27 ⁽³⁾	10 7	14 27 ⁽⁵⁾	8 7	28 27 ⁽⁷⁾	13 7	3 27	2 7
S	63 34 ⁽⁴⁾	45 17	54 34 ⁽⁶⁾	39 17	81 34 ⁽⁸⁾	53 17	9 34	6 17
F	1 2	1 0	1 2	0 1	1 2	1 0	0 2	1 0
SS07	2 1	2 2	1 1	2 2	4 1	2 2	1 1	0 2
SF1	3 2	5 1	2 2	5 1	7 2	6 1	1 2	0 1
FF1	1 0	0 2	1 0	0 2	1 0	0 2	0 0	0 2
FS07	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1
FISO7	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0

NOTAS: *Paciente x Familiar: ⁽¹⁾ p=0,023; pc=0,069

* Paciente x "Familiar EmA-": ⁽²⁾ p=0,018; pc=0,054

*Familiar x Controle: ⁽³⁾ p=0,0041; pc=0,0123

* "Familiar EmA-" x Controle: ⁽⁵⁾ p=0,0051; pc=0,0153

⁽⁴⁾ p=0,0048; pc= 0,0144; RR=2,55

⁽⁶⁾ p=0,0037; pc=0,0111; RR=2,76

* Família completa x Controle: ⁽⁷⁾ p=0,0101; pc=0,0303; ⁽⁸⁾ p=0,0258; pc=0,0774; RR=1,92

* Demais comparações: não significantes para todos os fenótipos

ANEXO

ANEXO 1 – CARTA DA COMISSÃO DE ÉTICA	174
--	-----

Curitiba, 22 de fevereiro de 2.001.

Ilmo (a) (s) Sr. (a)(s)
Dra. Shirley Ramos da Rosa Utiyama

Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

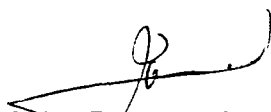
Comunicamos que o Projeto de Pesquisa “VARIABILIDADE GENÉTICA DOS COMPONENTES C3 E BF DO SISTEMA COMPLEMENTO EM PACIENTES COM DOENÇA CELÍACA E FAMILIARES”, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde.

Protocolo CEP-HC nº 310.020/2001-02

O referido projeto foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em reunião realizada no dia 20 de fevereiro de 2.001.

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente



Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR